LEHNINGHER

PRINCÍPIOS

DE

BIOQUÍMICA

David L. Nelson
Michael M. Cox

TERCEIRA EDIÇÃO

PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA

LEHNINGHER

David L. Nelson
Michael M. Cox

TERCEIRA EDIÇÃO

CAPÍTULO 1

A Lógica Molecular da Vida

Os organismos vivos são compostos de moléculas destituídas de vida. Quando essas moléculas são isoladas e examinadas individualmente, elas obedecem a todas as leis físicas e químicas que descrevem o comportamento da matéria inanimada. Não obstante, os organismos vivos possuem atributos extraordinários que não são exibidos por uma coleção de moléculas escolhidas ao acaso. Neste capítulo, consideraremos primeiro as propriedades dos organismos vivos que os distinguem de outras porções da matéria. Depois de chegarmos a uma definição geral da vida, poderemos descrever um conjunto de princípios que caracterizam todos os organismos vivos. Esses princípios fundamentam a organização dos organismos e das células que os constituem e fornecem a base para a estrutura deste livro. Eles ajudarão você a ter em mente o grande quadro da vida enquanto explora os exemplos ilustrativos apresentados no texto.

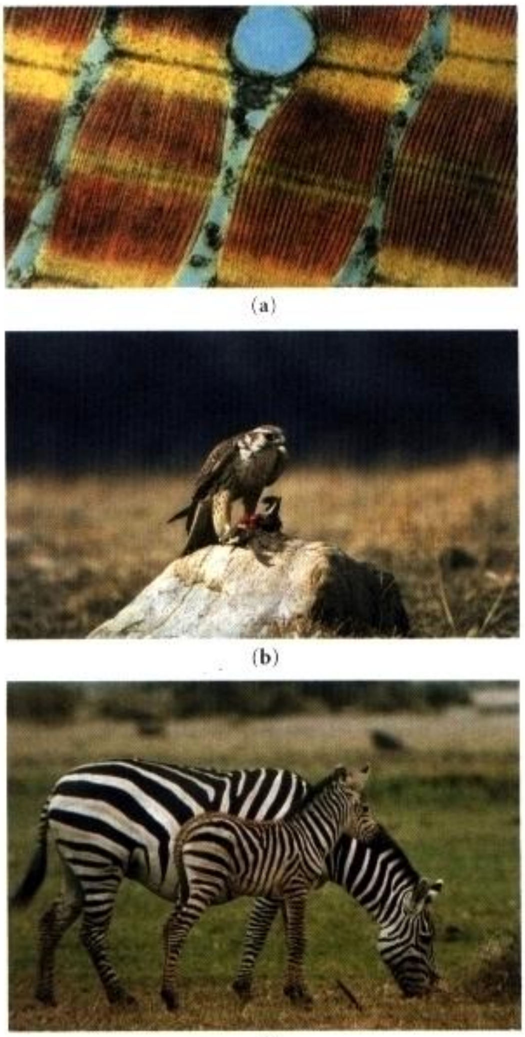
A Unidade Química dos Diferentes Organismos Vivos

O que distingue os organismos vivos dos objetos inanimados? Primeiro é seu grau de complexidade química e de organização. Eles possuem estruturas celulares internas intrincadas (Fig. 1-1a) e contêm muitas espécies de moléculas complexas. Em contraste, a matéria inanimada existente em nosso meio — terra, areia, rochas, água do mar — usualmente consiste de misturas de compostos químicos relativamente simples.

Segundo, os organismos vivos extraem, transformam e usam a energia que encontram no meio ambiente (Fig. 1-1b), habitualmente na forma de nutrientes químicos ou de energia radiante da luz solar. Essa energia torna os organismos vivos capazes de construir e manter suas próprias estruturas intrincadas e de realizar trabalho mecânico, químico, osmótico e de vários outros tipos. Em contraste, a matéria inanimada não usa a energia de forma sistemática para manter a sua estrutura ou para realizar trabalho. A matéria inanimada tende a se degenerar em um estado mais desordenado, alcançando um equilíbrio com o seu meio ambiente.

O terceiro e mais característico atributo dos organismos vivos é a capacidade para a auto-replicação e automontagem, propriedades que podem ser vistas como a quinta-essência do estado vivo (Fig. 1-1c). Uma única célula bacteriana colocada num meio nutriente estéril pode dar origem a um bilhão de células filhas idênticas, no espaço de 24 horas. Cada uma das células contém milhares de moléculas diferentes, algumas extremamente complexas; mesmo assim, cada bactéria é uma cópia fiel da original, construída inteiramente a partir da informação contida no interior do material genético da célula original.

Embora a capacidade de autoduplicar-se não tenha nenhum análogo verdadeiro no mundo da matéria inanimada, existe uma analogia instrutiva no crescimento de cristais, que ocorre nas soluções saturadas. A cristalização produz acréscimo de material idêntico, em estrutura de rede, ao do cristal original. Os cristais são muito menos complexos do que os mais simples organismos vivos, suas estruturas são estáticas e não dinâmicas, como as das células vivas. Não obstante, a capacidade de os cristais "reproduzirem" sua própria estrutura permitiu ao físico Erwin Schrödinger propor, em seu famoso ensaio "O que é a vida?", que o material genético das células deveria ter as propriedades de um cristal. Esse ensaio de Schrödinger é de 1944 (anos antes


(a)

(b)

(c)

Figura 1-1 – Algumas características da matéria viva. (**a**) Visto ao microscópio eletrônico, esse pedaço de tecido muscular de vertebrado evidencia sua complexidade e organização. (**b**) O falcão adquire nutrientes pela ingestão de pássaros menores. (**c**) A reprodução biológica ocorre com fidelidade próxima da perfeição.

Erwin Schrödinger
(1887-1961)

do atual entendimento da estrutura do gene ter sido estabelecido), mas descreve de forma acurada muitas das propriedades do ácido desoxirribonucléico, o material dos genes.

Cada componente de um organismo vivo tem uma função específica. Isso é verdade não somente para as estruturas macroscópicas, como folhas e caules ou corações e pulmões, mas também para as estruturas intracelulares microscópicas, como os núcleos e os cloroplastos. Até mesmo os compostos químicos individuais, existentes nas células, têm funções específicas. O inter-relacionamento entre os componentes químicos de um organismo vivo é dinâmico; alterações em um componente provocam mudanças coordenadas ou compensatórias em outro, tendo como resultado o conjunto exibindo características que vão além daquelas exibidas pelos constituintes individuais. A coleção de moléculas executa um programa, cujo resultado final é a reprodução do programa e a autoperpetuação daquela coleção de moléculas, em suma, vida.

A bioquímica procura explicar a vida em termos químicos

Se os organismos vivos são compostos de moléculas intrinsecamente inanimadas, como podem essas moléculas exibir a extraordinária combinação de características que chamamos de vida? Como pode ser que um organismo vivo pareça ser mais do que a soma de suas partes inanimadas? Os filósofos, uma vez, responderam que os organismos vivos são dotados de uma força vital divina e misteriosa, mas essa doutrina (vitalismo) tem sido firmemente rejeitada pela ciência moderna. O objetivo básico da ciência bioquímica é mostrar como as coleções de moléculas inanimadas, que constituem os organismos vivos, interagem entre si para manter e perpetuar a vida animada, exclusivamente pelas leis químicas que governam o universo não vivo.

Organismos vivos são enormemente diferentes (Fig. 1-2). Na aparência e função, pássaros e bestas, árvores, gramas e organismos microscópicos diferem grandemente. Até o momento, pesquisas bioquímicas revelam que todos os organismos são notadamente semelhantes em níveis celular e químico. Bioquímica descreve em termos moleculares as estruturas, os mecanismos e os processos químicos compartilhados por todos os organismos, e fornece os princípios organizacionais que fundamentam a vida em todas as suas diferentes formas, princípios esses que coletivamente serão referidos como *a lógica molecular da vida*. Embora a bioquímica produza importantes visões do conhecimento e das aplicações práticas em medicina, agricultura, nutrição e indústria, ela está, em última instância, preocupada e interessada na maravilha que a vida é em si mesma.

Embora a vida seja fundamentalmente unitária, é importante reconhecer que pouquíssimas generalizações a respeito dos organismos vivos são absolutamente corretas para todos eles e sob quaisquer condições. A variação de habitat nos quais os organismos vivem, desde fontes termais quentes até tundra ártica, de intestinos de animais a dormitórios de residências estudantis, é acompanhada por uma variação igualmente ampla de adaptações bioquímicas específicas. Essas adaptações são integradas em um padrão químico fundamental, compartilhado por todos os organismos. Embora as generalizações não sejam perfeitas, elas permanecem úteis. De fato, as exceções geralmente iluminam as generalizações científicas.

Figura 1-2 – Organismos vivos diferentes compartilham características químicas iguais. Pássaros, animais, plantas e microrganismos do solo compartilham com o homem as mesmas unidades estruturais básicas (células), os mesmos tipos de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) construídas com os mesmos tipos de unidades monoméricas (nucleotídeos, aminoácidos). Utilizam as mesmas vias para a síntese de componentes celulares, compartilham o mesmo código genético e os mesmos ancestrais evolucionários. ("O jardim do Éden" (detalhe), por Jan van Kessel, O Jovem (1626-1679).)

Todas as macromoléculas são construídas a partir de poucos compostos simples

A maioria dos constituintes moleculares dos sistemas vivos é composta de átomos de carbono unidos covalentemente a outros átomos de carbono e a átomos de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. As propriedades especiais de ligação do carbono permitem a formação de uma grande variedade de moléculas. Os compostos orgânicos de peso molecular (também chamado de massa molecular relativa, M_r)[1] menor que aproximadamente 500, como aminoácidos, nucleotídeos e monossacarídeos, servem como **subunidades monoméricas** de proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos, respectivamente. Uma única molécula protéica pode ter 1.000 ou mais aminoácidos, e o ácido desoxirribonucléico tem milhões de nucleotídeos.

Cada célula da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) contém mais de 6.000 tipos diferentes de compostos orgânicos, incluindo perto de 3.000 proteínas diferentes e um número similar de moléculas de ácidos nucléicos e centenas de tipos de carboidratos e lipídios. Em humanos pode haver dezenas de milhares de tipos diferentes de proteínas, assim como muitos tipos de polissacarídeos (cadeias de açúcares simples), uma grande variedade de lipídios e muitos outros compostos de peso molecular menor.

Purificar e caracterizar exatamente todas essas moléculas seria um trabalho insuperável se não fosse o fato de cada classe de **macromoléculas** (proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos) ser composta de um pequeno conjunto de subunidades monoméricas comuns. Essas subunidades monoméricas podem ser unidas covalentemente em uma variedade virtualmente ilimitada de seqüências (Fig. 1-3), exatamente como as 26 letras do alfabeto inglês podem ser arranjadas em um número ilimitado de palavras, sentenças ou livros.

Os **ácidos desoxirribonucléicos (DNA)** são constituídos de apenas quatro tipos diferentes de unidades monoméricas simples, os desoxirribonucleotídeos; e os **ácidos ribonucléicos (RNA)** são compostos por apenas quatro tipos de ribonucleotídeos. As **proteínas** são compostas de 20 tipos diferentes de aminoácidos. Os oito tipos de nucleotídeos com os quais todos os ácidos nucléicos são constituídos e os 20 tipos de aminoácidos com os quais todas as proteínas são constituídas são idênticos em todos os organismos vivos.

A maioria das subunidades monoméricas com as quais todas as macromoléculas são constituídas exerce mais de uma função nas células vivas. Os nucleotídeos servem não apenas como subunidades para os ácidos nucléicos, mas também como moléculas transportadoras de energia. Os aminoácidos são subunidades das moléculas protéicas e também precursores de neurotransmissores, pigmentos e muitos outros tipos de biomoléculas.

Destas considerações podemos destacar alguns dos princípios da lógica molecular da vida:

- Todos os organismos vivos constroem moléculas a partir dos mesmos tipos de subunidades monoméricas.
- A estrutura de uma macromolécula determina sua função biológica específica.
- Cada gênero e espécie são definidos por seu conjunto distinto de macromoléculas.

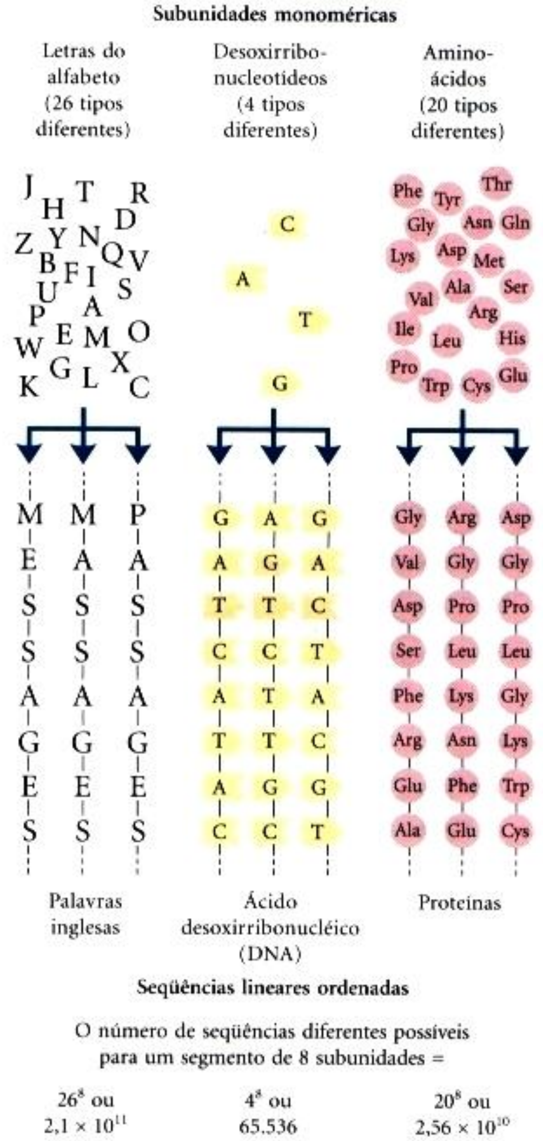

Subunidades monoméricas
Letras do alfabeto (26 tipos diferentes)
Desoxirribo-nucleotídeos (4 tipos diferentes)
Amino-ácidos (20 tipos diferentes)
J H T R D Z Y N Q V B F I U S A P E M O W G X K L C
C A T G
Phe Tyr Thr Gly Asn Gln Lys Asp Met Ala Ser Val Arg Ile Leu His Pro Trp Cys Glu
MESSAGES
MASSAGES
PASSAGES
GATCATAC
AGTCTTGC
GACTACGT
Gly Val Asp Ser Phe Arg Glu Ala
Arg Gly Pro Leu Lys Asn Phe Glu
Asp Gly Pro Leu Gly Lys Trp Cys
Palavras inglesas
Ácido desoxirribonucléico (DNA)
Proteínas
Seqüências lineares ordenadas
O número de seqüências diferentes possíveis para um segmento de 8 subunidades =
26⁸ ou 2,1 × 10¹¹
4⁸ ou 65.536
20⁸ ou 2,56 × 10¹⁰

Figura 1-3 – As subunidades monoméricas em seqüências lineares podem expressar mensagens infinitamente complexas. O número de diferentes seqüências possíveis (S) depende do número de diferentes tipos de subunidades (N) e do comprimento da seqüência linear (L): $S = N^L$. Para polímeros do tamanho de proteínas ($L \approx 400$), S é 20^{400} — um número astronômico.

A Produção de Energia e seu Consumo no Metabolismo

A energia é um tema central em bioquímica: as células e os organismos dependem de um suprimento constante de energia para poderem se opor à tendência, inexorável da natureza, de queda para níveis menores de estado energético. O armazenamento e a expressão da informação consomem energia; sem essa energia as estruturas ricas em informação tornar-se-iam inexoravelmente desordenadas e sem significado. As reações de síntese que ocorrem no interior das células, como os processos de síntese em uma fábrica, requerem o fornecimento de energia. A energia é consumida no movimento de uma bactéria ou em uma corrida olímpica, no acender das luzes de um vaga-lume ou na descarga de um peixe-elétrico. As células desenvolveram, durante a evolução, mecanismos altamente eficientes para capturar a energia do Sol, ou extraí-la de alimentos oxidáveis, e transferi-la para os processos que dela necessitam.

---

[1] Os termos usados para indicar o tamanho de uma molécula são freqüentemente confundidos. Nós usamos peso molecular ou M_r, massa molecular relativa, uma razão adimensional da massa de uma molécula para um doze avos ($^1\!/_{12}$) da massa do ^{12}C. O tamanho de uma molécula pode também ser corretamente dado em termos de massa molecular (m), que tem unidades de dáltons (Da) ou unidades de massa atômica (uma). Uma molécula nunca deve ser descrita como tendo um peso molecular ou M_r (uma propriedade adimensional) expresso em dáltons ou unidades de massa atômica.

Os organismos nunca estão em equilíbrio com seu ambiente

No curso da evolução biológica, um dos primeiros desenvolvimentos deve ter sido o aparecimento de uma membrana lipídica que envolveu as moléculas hidrossolúveis da célula primitiva, separando-as do meio ambiente e permitindo que elas se acumulassem em concentrações relativamente altas. As moléculas e os íons contidos no interior dos organismos vivos diferem em tipo e em concentração das existentes no meio ambiente. Por exemplo, as células de um peixe de água-doce contêm certos íons inorgânicos em concentrações muito diferentes das da água em que vivem (Fig. 1-4). Proteínas, ácidos nucléicos, açúcares e lipídios estão presentes no peixe, mas essencialmente ausentes no meio ambiente, o qual, por sua vez, contém átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio em moléculas mais simples como o dióxido de carbono e a água. Quando o peixe morre, as substâncias que o compõem entram, finalmente, em equilíbrio com aquelas do meio ambiente.

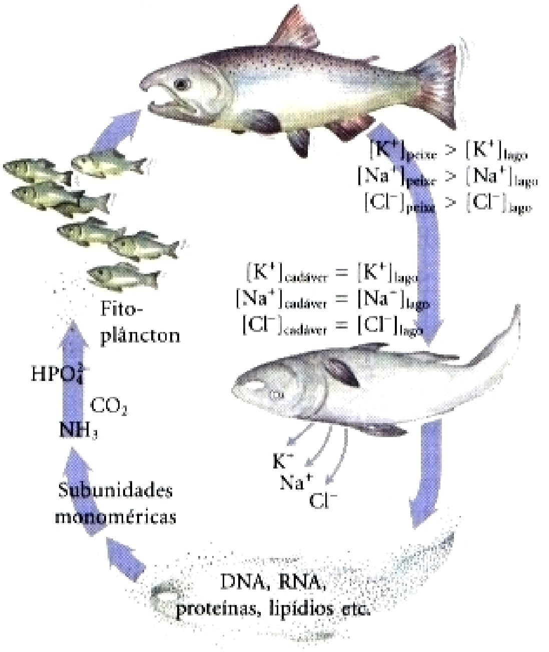

$[K^+]_{peixe} > [K^+]_{lago}$
$[Na^+]_{peixe} > [Na^+]_{lago}$
$[Cl^-]_{peixe} > [Cl^-]_{lago}$
$[K^+]_{cadáver} = [K^+]_{lago}$
$[Na^+]_{cadáver} = [Na^+]_{lago}$
$[Cl^-]_{cadáver} = [Cl^-]_{lago}$
Fito-plâncton
HPO_4^{2-}
CO_2
NH_3
K^+
Na^+
Cl^-
Subunidades monoméricas
DNA, RNA, proteínas, lipídios etc.

Figura 1-4 – Os organismos vivos não estão em equilíbrio com o meio ambiente. A morte e a decomposição restabelecem o equilíbrio. Durante o crescimento, a energia dos alimentos é empregada na construção de moléculas complexas e na concentração de íons existentes no ambiente. Quando o organismo morre, este perde a capacidade de obter energia a partir dos alimentos. Sem energia, o cadáver não pode manter gradientes de concentração e os íons passam para o ambiente. Inexoravelmente, os componentes macromoleculares decompõem-se em substâncias mais simples. Estes últimos servem como recursos nutricionais para o fitoplâncton, o qual, por sua vez, será ingerido por organismos maiores. Por convenção, os parênteses lineares [ ], ou colchetes, representam, no caso presente, concentração de espécies iônicas.

A composição molecular reflete um estado estacionário dinâmico

Embora a composição química de um organismo possa ser quase constante ao longo do tempo, a população de moléculas no interior de uma célula ou organismo está longe de ser estática. As moléculas são sintetizadas e depois desmontadas por reações químicas contínuas, envolvendo um fluxo constante de massa e energia através do sistema. As moléculas de hemoglobina que, neste momento, estão carregando oxigênio de seus pulmões para o seu cérebro foram sintetizadas durante o mês passado; dentro de um mês, elas serão degradadas e substituídas por novas moléculas. A glicose que você ingeriu em sua última refeição está agora circulando em sua corrente sangüínea; antes do dia terminar, essas moléculas de glicose terão sido convertidas em alguma outra substância, como dióxido de carbono ou gordura, e substituídas por um suprimento novo de moléculas de glicose. A quantidade de hemoglobina e glicose no sangue permanece quase constante porque a velocidade de síntese ou a ingestão de cada uma delas equilibra-se com a velocidade de quebra, consumo ou conversão em algum outro produto (Fig. 1-5). A constância da concentração não é, entretanto, reflexo da inércia química desses compostos, mas o resultado de um **estado estacionário dinâmico**.

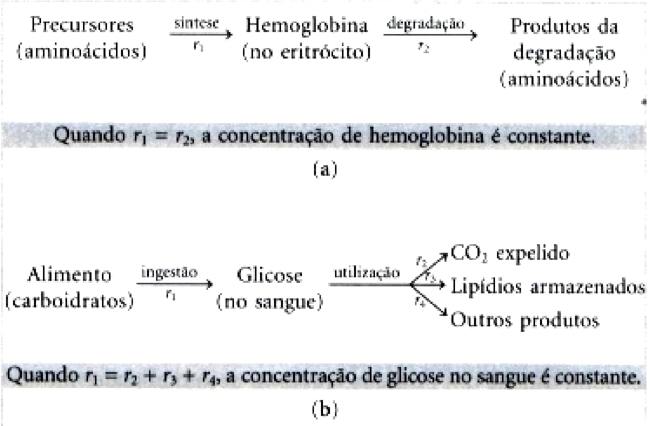

Precursores (aminoácidos)
síntese r_1
Hemoglobina (no eritrócito)
degradação r_2
Produtos da degradação (aminoácidos)
Quando $r_1 = r_2$, a concentração de hemoglobina é constante.
(a)
Alimento (carboidratos)
ingestão r_1
Glicose (no sangue)
utilização
r_2 CO_2 expelido
r_3 Lipídios armazenados
r_4 Outros produtos
Quando $r_1 = r_2 + r_3 + r_4$, a concentração de glicose no sangue é constante.
(b)

Figura 1-5 – Estado estacionário dinâmico. Um estado estacionário dinâmico acontece quando a velocidade de aparecimento de um componente celular é contrabalançada exatamente pela velocidade de seu desaparecimento. Neste esquema, r_1, r_2 etc. representam a velocidade dos vários processos. Em (**a**), uma proteína (hemoglobina) é sintetizada e, depois, degradada. Em (**b**), a glicose derivada dos alimentos (ou de carboidratos armazenados) entra na corrente sangüínea a partir de alguns tecidos (intestinos, fígado) e então abandona o sangue para ser consumida pelos processos metabólicos de outros tecidos (coração, cérebro, músculo esquelético). As concentrações do equilíbrio estacionário dinâmico da hemoglobina e da glicose são mantidas por mecanismos complexos que regulam as velocidades relativas dos processos mostrados nesta figura.

Os organismos transformam energia e matéria do meio ambiente

As células vivas e os organismos precisam realizar trabalho para permanecerem vivos e para se reproduzirem. A síntese contínua de componentes celulares requer trabalho químico; o acúmulo e a retenção de sais e de vários compostos orgânicos contra um gradiente de concentração envolvem um trabalho osmótico; a contração de um músculo ou o movimento do flagelo de uma bactéria representa trabalho mecânico. A bioquímica examina esses processos pelos quais a energia é extraída, canalizada e consumida; assim é essencial entender os princípios fundamentais da **bioenergética** — transformações ou trocas de energia das quais todos os organismos vivos dependem.

Para reações que ocorrem em solução, podemos definir um **sistema** como todos os reagentes e produtos, o solvente e a atmosfera próxima, ou seja, tudo o que está dentro de uma região definida do espaço. Juntos, o sistema e seus arredores, constituem o **universo**. Se o sistema não troca matéria nem energia com seus arredores, ele é dito ser **fechado**. Se o sistema troca energia mas não troca matéria com seu meio, ele é dito sistema **isolado**; se troca ambas, energia e matéria, com o meio, ele é um sistema **aberto**.

Um organismo vivo é um sistema aberto, ele troca matéria e energia com seu meio. Organismos vivos usam duas estratégias para captar enêrgia do seu meio: (1) eles obtêm combustíveis químicos da vizinhança e extraem a energia oxidando-os; ou (2) eles absorvem energia da luz solar.

✦ Organismos vivos criam e mantêm suas estruturas complexas e ordenadas usando energia extraída de combustíveis ou da luz solar.

A primeira lei da termodinâmica foi desenvolvida a partir de conhecimentos físicos e químicos, mas é totalmente válida para os sistemas biológicos; ela descreve o princípio da conservação de energia:

✦ Em qualquer mudança física ou química, a quantidade de energia total do universo permanece constante, embora a forma de energia possa mudar.

As células são transdutores consumados de energia, capazes de interconverter energia química, eletromagnética, mecânica e osmótica com grande eficiência (Fig. 1-6). Os transdutores biológicos de energia diferem da maioria das máquinas comuns que dependem de diferenças de pressão e temperatura. Uma máquina a vapor, por exemplo, converte a energia química do combustível em calor aumentando a temperatura de uma porção de água até seu ponto de ebulição para produzir vapor d'água em alta pressão, o qual aciona um mecanismo qualquer. O motor de combustão interna, da mesma forma, depende de mudanças na temperatura e na pressão. Em contraste, todas as partes de um organismo vivo precisam operar à mesma temperatura e pressão, e o fluxo de calor não é uma fonte utilizável de energia.

✦ As células vivas são motores químicos que funcionam à temperatura constante.

O fluxo de elétrons fornece energia para os organismos

Praticamente todos os seres vivos obtêm energia, direta ou indiretamente, da energia radiante da luz solar, a qual se origina de reações de fusão termonuclear que formam o elemento hélio e que ocorrem no interior do Sol (Fig. 1-7). As células fotossintéticas absorvem a energia radiante do Sol e a utilizam para retirar elétrons da molécula de água e adicioná-los à molécula de dióxido de carbono, formando produtos ricos em energia como o amido e a sacarose. Quando promovem essas reações, a maioria dos organismos fotossintéticos libera oxigênio molecular na atmosfera (Fig. 1-8). Em última análise, os organismos que não execu-

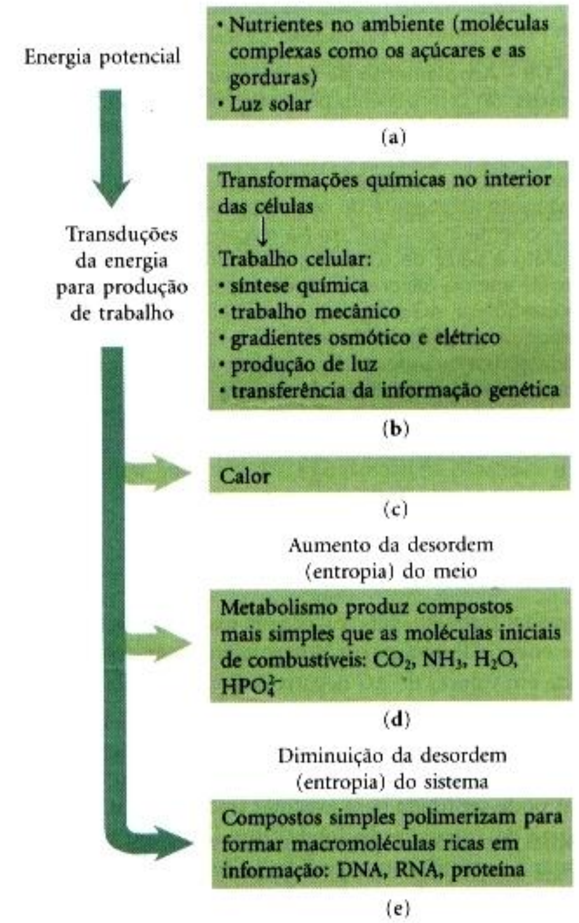

Energia potencial
• Nutrientes no ambiente (moléculas complexas como os açúcares e as gorduras)
• Luz solar
(a)
Transformações químicas no interior das células
Trabalho celular:
• síntese química
• trabalho mecânico
• gradientes osmótico e elétrico
• produção de luz
• transferência da informação genética
Transduções da energia para produção de trabalho
(b)
Calor
(c)
Aumento da desordem (entropia) do meio
Metabolismo produz compostos mais simples que as moléculas iniciais de combustíveis: CO_2, NH_3, H_2O, HPO_4^{2-}
(d)
Diminuição da desordem (entropia) do sistema
Compostos simples polimerizam para formar macromoléculas ricas em informação: DNA, RNA, proteína
(e)

Figura 1-6 – Durante as transduções metabólicas, a entropia aumenta à medida que diminui a energia potencial das moléculas nutrientes complexas. Os organismos vivos (**a**) extraem energia do seu meio ambiente, (**b**) convertem parte dela em formas de energia úteis para a produção de trabalho e (**c**) fazem retornar parte da energia para o meio ambiente na forma de calor, (**d**) liberam moléculas de produtos finais, os quais são menos organizados do que o alimento inicial, aumentando assim a entropia do universo. Um efeito dessas transformações é (**e**) aumento na ordem por meio da formação de macromoléculas complexas (diminuição da desordem do sistema). No Capítulo 14, retomaremos para o tratamento quantitativo de entropia.

4H
Fusão termonuclear
⁴He
Fótons de luz visível

Figura 1-7 – A luz solar é a fonte última de toda a energia biológica. As reações termonucleares no interior do Sol produzem energia que é transmitida para a Terra na forma de luz e convertida em energia química pelas plantas e certos microrganismos, por meio dos processos fotossintéticos.

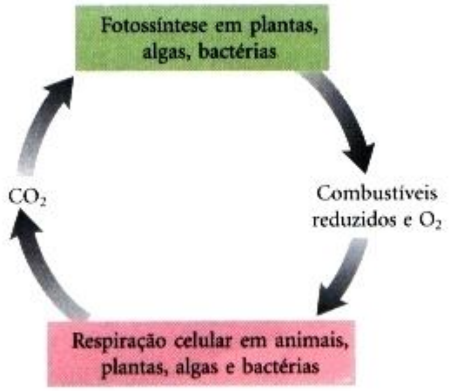

Fotossíntese em plantas, algas, bactérias
Combustíveis reduzidos e O_2
Respiração celular em animais, plantas, algas e bactérias
CO_2

Figura 1-8 – Organismos fotossintéticos (plantas, algumas algas e algumas bactérias) são os provedores finais de combustíveis — compostos ricos em energia e reduzidos — na biosfera. A energia da luz solar dirige a síntese de combustíveis, como sacarose e amido, com O_2 como um subproduto. Esses combustíveis ou os próprios organismos fotossintéticos são então uma fonte de alimento para animais, os quais oxidam a sacarose e o amido (usando O_2 e produzindo CO_2) para suprir energia. Esse processo de oxidação de combustível — respiração celular — é a fonte de energia para o metabolismo em ambos os organismos fotossintéticos e não-fotossintéticos.

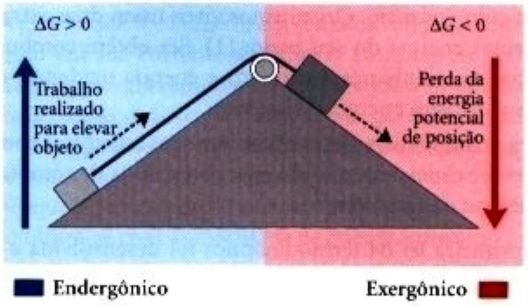
tam a fotossíntese obtêm energia para as suas necessidades pela oxidação dos produtos ricos em energia elaborados pela fotossíntese, passando elétrons para o oxigênio atmosférico e sintetizando água, dióxido de carbono e outros produtos finais, os quais são reciclados no meio ambiente. Virtualmente todos os transdutores de energia nas células podem ser relacionados ao fluxo de elétrons de uma molécula para outra na oxidação de combustíveis ou na captura de energia luminosa durante a fotossíntese. Esse fluxo de elétrons é "morro-abaixo", quer dizer, de um potencial eletroquímico maior para outro menor; como tal, ele é formalmente análogo ao fluxo de elétrons em um circuito elétrico acionado por uma bateria. Todas essas reações que envolvem fluxos de elétrons são **reações de oxirredução**. Assim, emergem outros princípios característicos do estado vivo da matéria:

- As necessidades energéticas de, virtualmente, todos os organismos são providas, direta ou indiretamente, da energia solar.
- O fluxo de elétrons nas reações de oxirredução é a base da transdução e da conservação da energia nas células vivas.
- Todos os organismos vivos são interdependentes, trocando entre si energia e matéria por meio do meio ambiente.

Acoplamento de energia liga as reações químicas em biologia

O tema central em bioenergética é o modo pelo qual a energia do metabolismo de combustíveis ou da captura de luz é acoplada a reações que requerem energia. Considere o exemplo mecânico simples de acoplamento de energia mostrado na Figura 1-9a. Um objeto no alto de um plano inclinado tem uma certa quantidade de energia potencial devido à sua altura. Esse objeto tende a deslizar para baixo espontaneamente, perdendo a sua energia potencial de posição na medida em que se aproxima do solo. Quando um instrumento apropriado, constituído de correias e polias, é ligado ao objeto, o movimento espontâneo para baixo pode realizar uma certa quantidade de trabalho, quantidade esta nunca maior que a variação da energia potencial de posição. A quantidade de energia realmente disponível para realização de trabalho, chamada de **energia livre**, *G*, será sempre um pouco menor que a variação total em energia, porque uma parte dela é dissipada como calor de fricção. Quanto maior a elevação do objeto em relação à sua posição final, maior será a variação da energia quando ele desliza para baixo, e maior a quantidade de trabalho que pode ser realizado.

(a) Exemplo mecânico


$\Delta G > 0$
$\Delta G < 0$
Trabalho realizado para elevar objeto
Perda da energia potencial de posição
■ Endergônico
Exergônico ■

(b) Exemplo químico

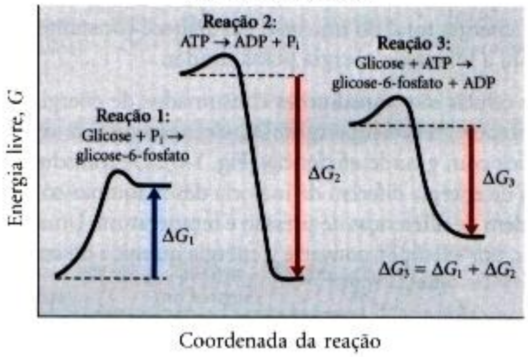

Reação 2:
$ATP \rightarrow ADP + P_i$
Reação 3:
Glicose + ATP → glicose-6-fosfato + ADP
Reação 1:
Glicose + P_i → glicose-6-fosfato
ΔG_1
ΔG_2
ΔG_3
$\Delta G_3 = \Delta G_1 + \Delta G_2$
Energia livre, G
Coordenada da reação

Figura 1-9 – Acoplamento de energia em processos mecânicos e químicos. (**a**) O movimento para baixo de um objeto libera energia potencial que pode realizar trabalho. A energia potencial tornada disponível pelo movimento descendente espontâneo (um processo exergônico), representado em cor-de-rosa, pode ser acoplada ao movimento ascendente de outro objeto (um processo endergônico), representado em azul. (**b**) Na reação 1, a formação de glicose-6-fosfato a partir de glicose e fosfato inorgânico, P_i, forma um produto de energia maior que aquela dos dois reagentes. Para essa reação exergônica, ΔG é positivo. Na reação 2, a quebra exergônica de adenosina trifosfato (ATP; veja Fig. 1-10) pode dirigir uma reação endergônica quando as duas reações são acopladas. A reação exergônica tem uma variação de energia livre grande e negativa (ΔG_2), e a reação endergônica tem uma variação de energia livre positiva e menor (ΔG_1). A terceira reação efetua a soma das reações 1 e 2, e a variação de energia livre ΔG_3 é a soma aritmética de ΔG_1 e ΔG_2. Por ser o valor de ΔG_3 negativo, a reação total é exergônica e ocorre espontaneamente.

Reações químicas podem ser acopladas assim que uma reação liberadora de energia promove uma reação que requer energia. Reações químicas em sistemas fechados ocorrem espontaneamente até que o **equilíbrio** seja alcançado. Quando um sistema está em equilíbrio, a velocidade de formação do produto é exatamente igual à velocidade na qual o produto é convertido para reagente. Portanto, não existe nenhuma variação líquida nas concentrações de reagentes e produtos, e um "estado estacionário" é alcançado. A variação de energia, que ocorre enquanto o sistema se move de seu estado inicial para o equilíbrio, a pressão e a temperatura constantes, é dada pela **variação de energia livre, ΔG**. A grandeza de ΔG depende da reação química particular e de quanto o sistema inicialmente está longe do equilíbrio. Cada composto envolvido em uma reação química contém uma certa quantidade de energia potencial relacionada com o tipo e o número de suas ligações. Nas reações que ocorrem espontaneamente, os produtos têm menos energia livre que os reagentes, assim a reação libera energia livre, que está disponível para realizar trabalho. Tais reações são **exergônicas**, e a diminuição da energia livre a partir dos reagentes para os produtos é expressa em valores de ΔG negativos. Reações **endergônicas** requerem uma quantidade de energia, e seus valores de ΔG são, portanto, positivos. Assim como nos processos mecânicos, somente parte da energia liberada nas reações bioquímicas exergônicas pode ser usada para executar trabalho. Nos sistemas vivos, parte da energia é dissipada como calor ou perdida para aumentar a entropia, uma medida da desorganização, que será definida com mais rigor no Capítulo 14.

Nos organismos vivos, como no exemplo mecânico na Figura 1-9a, uma reação exergônica pode ser acoplada a uma reação endergônica ou a um processo para conduzir reações diferentes desfavoráveis. A Figura 1-9b ilustra esse princípio para o caso da síntese de glicose-6-fosfato, uma reação que ocorre em células do músculo. A maneira mais simples de produzir glicose-6-fosfato seria pela reação 1, que é endergônica (P_i é uma abreviação para fosfato inorgânico, HPO_4^{2-}. Não se preocupem com as estruturas desses compostos agora; elas serão descritas em detalhes mais adiante).

Reação 1: Glicose + P_i → glicose-6-fosfato (endergônica, ΔG é positivo)

Nesta reação, o produto contém mais energia que os reagentes. Uma segunda reação, muito exergônica, pode ocorrer nas células vivas.

Reação 2: ATP → ADP + P_i (exergônica, ΔG é negativo)

Nesta reação, os produtos contêm *menos* energia que os reagentes — a reação libera energia. As duas reações químicas compartilham um intermediário comum, P_i, o qual é consumido na reação 1 e produzido na reação 2. As duas reações podem ser acopladas na forma de uma reação 3, que é escrita como a soma das reações 1 e 2, com o intermediário comum P_i omitido dos dois lados da equação:

Reação 3: Glicose + ATP → glicose-6-fosfato + ADP

Por ser a energia liberada na reação 2 maior do que aquela consumida na reação 1, a reação 3 é exergônica: alguma energia é liberada (ΔG_3 na Fig. 1-9b). Células vivas então sintetizam glicose-6-fosfato, catalisando uma reação direta entre glicose e ATP, de fato acoplando a reação 1 à reação 2.

O acoplamento de reações endergônicas com aquelas exergônicas é absolutamente central para trocas de energia nos sistemas vivos. O mecanismo pelo qual o acoplamento de energia ocorre nas reações biológicas é via um intermediário compartilhado. Veremos que na reação 2, na Figura 1-9b, a quebra de **adenosina trifosfato (ATP)** é a reação exergônica, que dirige muitos processos endergônicos, nas células. De fato ATP (Fig. 1-10) é o maior transportador de energia química em todas as células, acoplando processos endergônicos àqueles exergônicos. O grupo fosfato terminal do ATP, sombreado em rosa-escuro na Figura 1-10, é transferido para uma variedade de moléculas receptoras, que são ativadas para favorecer transformações químicas. Adenosina difosfato (ADP) é reciclado (fosforilado) para ATP, à custa de energia química (durante oxidação dos combustíveis) ou da luz solar (na fotossíntese celular).

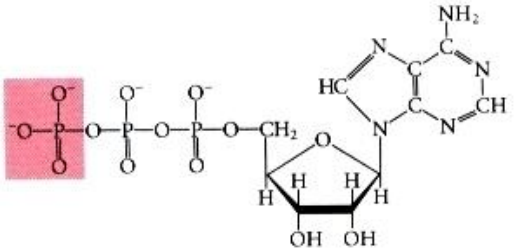


Figura 1-10 – Adenosina trifosfato (ATP). A remoção do grupo fosfato terminal do ATP (sombreado em rosa-escuro) é altamente exergônica e esta reação é acoplada a muitas reações endergônicas na célula, como no exemplo descrito na Figura 1-9b.

- Reações celulares endergônicas são dirigidas pelo seu acoplamento a processos químicos ou fotoquímicos exergônicos por meio de intermediários químicos compartilhados.

As enzimas promovem reações químicas em cadeia

O fato de uma reação ser exergônica não significa que ela necessariamente se processará de forma rápida. O caminho que vai do reagente ao produto quase invariavelmente envolve uma barreira energética, chamada barreira da ativação (Fig. 1-11), a qual precisa ser superada para que qualquer reação ocorra. A quebra e a síntese de ligações geralmente requerem o tensionamento e a torção das ligações existentes, criando **um estado de transição** de alto nível de energia livre, tanto em relação ao reagente quanto ao produto. O ponto mais alto da coordenada da reação, no diagrama, representa o estado de transição.

As barreiras de ativação são crucialmente importantes para a estabilidade das biomoléculas existentes nos sistemas vivos. Quando isoladas dos demais componentes celulares, a maioria das biomoléculas é estável por dias, ou mesmo anos, no interior das células; entretanto, elas sofrem transformações químicas em milissegundos. Sem a barreira de ativação, as biomoléculas no interior das células seriam rapidamente quebradas em forma simples e de pequeno conteúdo energético. O tempo de existência das moléculas complexas seria muito curto, e a extraordinária continuidade e organização da vida seriam impossíveis.

No interior das células, todas as reações químicas ocorrem devido à presença de **enzimas** — catalisadores que são capazes de aumentar enormemente a velocidade de reações químicas específicas sem serem consumidos no processo. As enzimas como catalisadores agem diminuindo a barreira de ativação entre o reagente e o produto. A **energia de ativação** ($\Delta G^{\ddagger}$; Fig. 1-11) requerida para superar essa barreira energética pode, em princípio, ser suprida pelo aquecimento da mistura de reação, mas essa opção não é possível nas células vivas. Assim, durante a reação, as enzimas ligam-se às moléculas dos reagentes no estado de transição, diminuindo, dessa maneira, a energia de ativação e acelerando enormemente a velocidade da reação (Fig. 1-12).

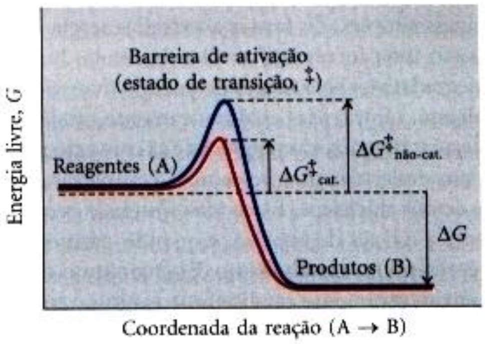


Figura 1-11 – Curso de uma reação química do ponto de vista energético. Uma barreira de ativação alta, representando o estado de transição, precisa ser vencida no processo de conversão dos reagentes (A) em produtos (B), ainda que os produtos sejam mais estáveis que os reagentes — como indicado por uma variação de energia livre grande (ΔG). A energia necessária para vencer a barreira de ativação é a energia de ativação ($\Delta G^{\ddagger}$). As enzimas catalisam as reações diminuindo a barreira de ativação. Ligam-se aos intermediários no estado de transição de forma muito firme, e a energia de ligação dessa interação reduz efetivamente a energia de ativação de $\Delta G^{\ddagger}_{\text{não-catalisado}}$ para $\Delta G^{\ddagger}_{\text{catalisado}}$. (Note que a energia de ativação não é relacionada com a variação da energia livre da reação ΔG.)

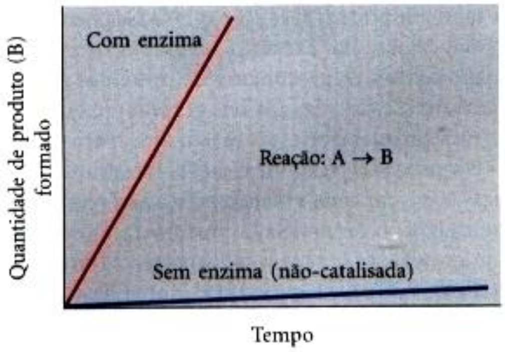


Figura 1-12 – Uma enzima aumenta a velocidade de uma reação química específica. Na presença de uma enzima específica para a conversão de um reagente A em um produto B, a velocidade da reação pode aumentar um milhão de vezes, ou mais, em relação à velocidade da reação não-catalisada. A enzima não é consumida no processo; uma molécula de enzima pode agir repetidamente na conversão de muitas moléculas de A para B.

A relação entre a energia de ativação e a velocidade da reação é exponencial; uma pequena diminuição no $\Delta G^{\ddagger}$ resulta em um grande aumento na velocidade da reação. As reações catalisadas por enzimas normalmente se processam a velocidades ao redor de 10^{10} até 10^{14} vezes maior do que as reações não catalisadas.

As enzimas são proteínas, com um número muito pequeno de exceções, como moléculas de RNA, que serão consideradas no Capítulo 26. Cada proteína enzimática é específica para a catálise de uma determinada reação, e cada reação no interior da célula é catalisada por uma enzima diferente. Cada célula requer, portanto, milhares de tipos diferentes de enzimas. A multiplicidade de enzimas, a sua alta especificidade para os reagentes e a sua suscetibilidade à regulação dão às células a capacidade de diminuir as barreiras de ativação seletivamente. Essa seletividade é crucial na eficaz regulação dos processos celulares.

Os milhares de reações químicas enzimaticamente catalisadas nas células são funcionalmente organizadas em muitas seqüências diferentes de reações consecutivas chamadas **vias**, nas quais o produto de uma reação se torna o reagente para a próxima reação (Fig. 1-13). Algumas dessas seqüências de reações enzimaticamente catalisadas degradam nutrientes orgânicos em produtos finais simples, de forma a extrair energia química e convertê-la em uma forma utilizável pela célula. Juntos, esses processos degradativos liberadores de energia livre são designados **catabolismo**. Outras vias enzimaticamente catalisadas partem de moléculas precursoras pequenas e as convertem, progressivamente, em moléculas maiores e mais complexas, incluindo proteínas e ácidos nucléicos. Essas vias sintéticas requerem invariavelmente a adição de energia, e quando consideradas em conjunto representam o **anabolismo**. Esse conjunto de vias imbricadas e enzimaticamente catalisadas constitui o que chamamos de **metabolismo**. O ATP é o mais importante elo de conexão (intermediário compartilhado) entre os componentes catabólicos e anabólicos dessas vias (Fig. 1-14). Essas redes de reações catalisadas por enzimas são virtualmente idênticas em todos os organismos vivos.

- O ATP é transportador universal de energia metabólica e une o catabolismo e o anabolismo.

O metabolismo é regulado para ser econômico e equilibrado

As células vivas não só podem sintetizar simultaneamente milhares de tipos diferentes de moléculas de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos e suas subunidades mais simples, mas também podem fazê-lo nas precisas proporções requeridas pelas células. Por exemplo, quando ocorre uma rápida multiplicação celular, os precursores de proteínas e ácidos nucléicos precisam ser sintetizados em grandes quantidades, enquanto as necessidades por esses precursores para células, que não estão em processo de multiplicação, são muito reduzidas. As enzimas-chave em cada via metabólica são reguladas de tal forma que cada tipo de molécula precursora é produzido em quantidade apropriada às necessidades correntes da célula. Considere a via mostrada na Figura 1-15, a qual leva à síntese da isoleucina (um dos aminoácidos, as subunidades monoméricas das proteínas). Se a célula começa a produzir mais isoleucina do que o necessário para a síntese protéica, a isoleucina não utilizada se acumula. Altas concentrações de isoleucina inibem a atividade catalítica da primeira enzima na via, diminuindo, imediatamente, a produção desse aminoácido. Essa **retroalimentação** ("feedback") **negativa** mantém em equilíbrio a produção e a utilização de cada intermediário metabólico.

$$A \xrightarrow{\text{enzima 1}} B \xrightarrow{\text{enzima 2}} C \xrightarrow{\text{enzima 3}} D \xrightarrow{\text{enzima 4}} E \xrightarrow{\text{enzima 5}} F$$

Figura 1-13 – Uma via metabólica linear. Nesta via, o reagente A é convertido no produto F após cinco etapas, sendo que cada etapa é catalisada por uma enzima específica para cada reação.

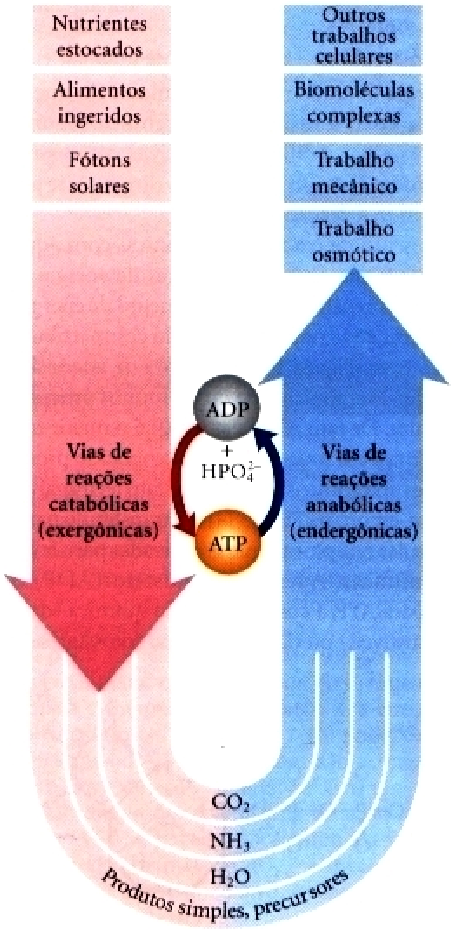


Figura 1-14 – O ATP é o intermediário químico que une os processos celulares liberadores de energia com aqueles que a consomem. Na célula, seu papel é análogo àquele do dinheiro na economia: ele é "produzido/ganho" nas reações exergônicas e "gasto/consumido" nas endergônicas.

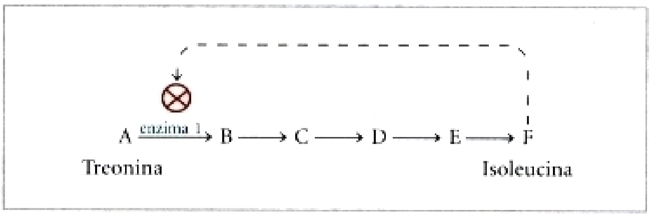


Figura 1-15 – Inibição retroativa. A regulação de uma via biossintética por inibição retroativa ("feedback"), uma via sintética típica (anabólica) na bactéria *E. coli*. Na via de biossíntese da isoleucina a partir da treonina, o acúmulo do produto, isoleucina (F), provoca a inibição da primeira reação da via; a isoleucina liga-se à enzima que catalisa esta reação, reduzindo sua atividade. (As letras de A a F representam os compostos ou intermediários desta via.)

As células vivas também regulam a síntese dos seus catalisadores, as enzimas. Assim, uma célula pode desativar a síntese de uma enzima necessária para a produção de um determinado produto, enquanto esse produto é obtido já pronto do meio ambiente. Essas propriedades de auto-ajustar-se e auto-regular-se permitem às células manterem-se em um estado de equilíbrio dinâmico, a despeito das flutuações do ambiente externo.

- ✦ As células vivas são máquinas químicas auto-reguladas e ajustadas para uma economia máxima.

Transferência da Informação Biológica

A existência permanente de espécies biológicas requer que sua informação genética seja mantida em uma forma estável e, ao mesmo tempo, expressa com um número muito pequeno de erros. O armazenamento efetivo e a expressão acurada da mensagem genética definem cada espécie individual, distinguem-nas umas das outras e asseguram a sua continuidade por gerações sucessivas.

Entre as descobertas mais produtivas da biologia do século XX estão a natureza química e a estrutura tridimensional do material genético, o DNA. A seqüência de desoxirribonucleotídeos no polímero linear codifica as instruções para a formação de todos os outros componentes celulares e proporciona um molde para a reprodução de moléculas idênticas de DNA a serem distribuídas para as células filhas, ou progênie, quando a célula se multiplica.

A continuidade genética é atribuição das moléculas de DNA

Talvez a mais notável de todas as propriedades das células e organismos vivos seja sua habilidade de reproduzir-se com fidelidade quase perfeita por incontáveis gerações. Essa continuidade de características transmitidas hereditariamente implica a constância, por milhares ou milhões de anos, da estrutura das moléculas que contêm a informação genética. Pouquíssimos registros históricos da civilização, mesmo aqueles gravados em cobre ou rocha, têm sobrevivido por mais de um milhão de anos. Mas existe uma boa evidência de que as instruções genéticas dos organismos vivos têm permanecido quase imutáveis por períodos muito mais longos; muitas bactérias têm aproximadamente os mesmos tamanhos, formas, estruturas internas, e contêm os mesmos tipos de precursores moleculares e enzimas, como aquelas que viveram bilhões de anos atrás (Fig. 1-16).

A informação hereditária é preservada no DNA, um polímero orgânico longo e fino tão frágil que sua molécula é fragmentada sob a ação das forças que aparecem em uma solução quando agitada ou pipetada. O espermatozóide ou o óvulo humano, carregando a informação hereditária acumulada por milhões de anos de evolução, transmite essas instruções na forma de moléculas de DNA, no qual a seqüência linear de nucleotídeos unidos covalentemente codifica a mensagem genética.

A estrutura do DNA permite seu reparo e sua replicação com fidelidade quase perfeita

A capacidade das células vivas de preservar o seu material genético para a geração seguinte resulta da complementaridade estrutural entre as duas metades da molécula do DNA (Fig. 1-17). A unidade básica do DNA é um polímero linear de quatro subunidades monoméricas diferentes, os **desoxirribonucleotídeos** (veja Fig. 1-3), arranjados em uma seqüência linear precisa. É essa seqüência linear que codifica a informação genética. Duas dessas fitas poliméricas são enroladas uma ao redor da outra para formar a dupla hélice do DNA, na qual cada subunidade monomérica em uma fita faz par com a subunidade complementar na fita oposta. Na replicação enzimática ou no reparo

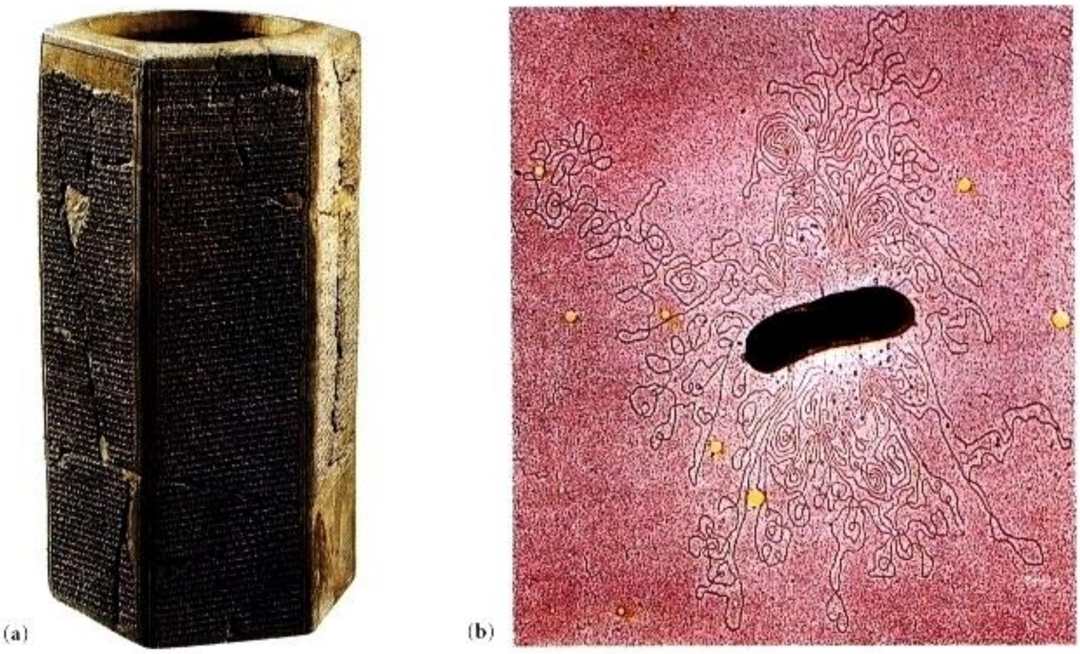

(a) (b)

Figura 1-16 – Dois registros muito antigos. (**a**) O Prisma de Senaquerib, inscrito cerca de 700 a.C., descreve em caracteres da linguagem assíria alguns eventos históricos do reinado de Senaquerib. O Prisma contém perto de 20.000 caracteres, pesa cerca de 50kg e sobreviveu quase que intacto por 2.700 anos. (**b**) A única molécula de DNA da bactéria *E. coli*, a qual parece escoar de uma célula rompida, é centenas de vezes mais comprida do que a própria célula e contém, na forma codificada, toda a informação necessária para especificar as estruturas e funções celulares. O DNA bacteriano contém perto de 10 milhões de caracteres (nucleotídeos), pesa menos de 10^{-10}g e sofreu mudanças relativamente pequenas durante os últimos milhões de anos. Os pontos amarelos e as manchinhas escuras são artefatos da preparação, nesta micrografia eletrônica colorida.

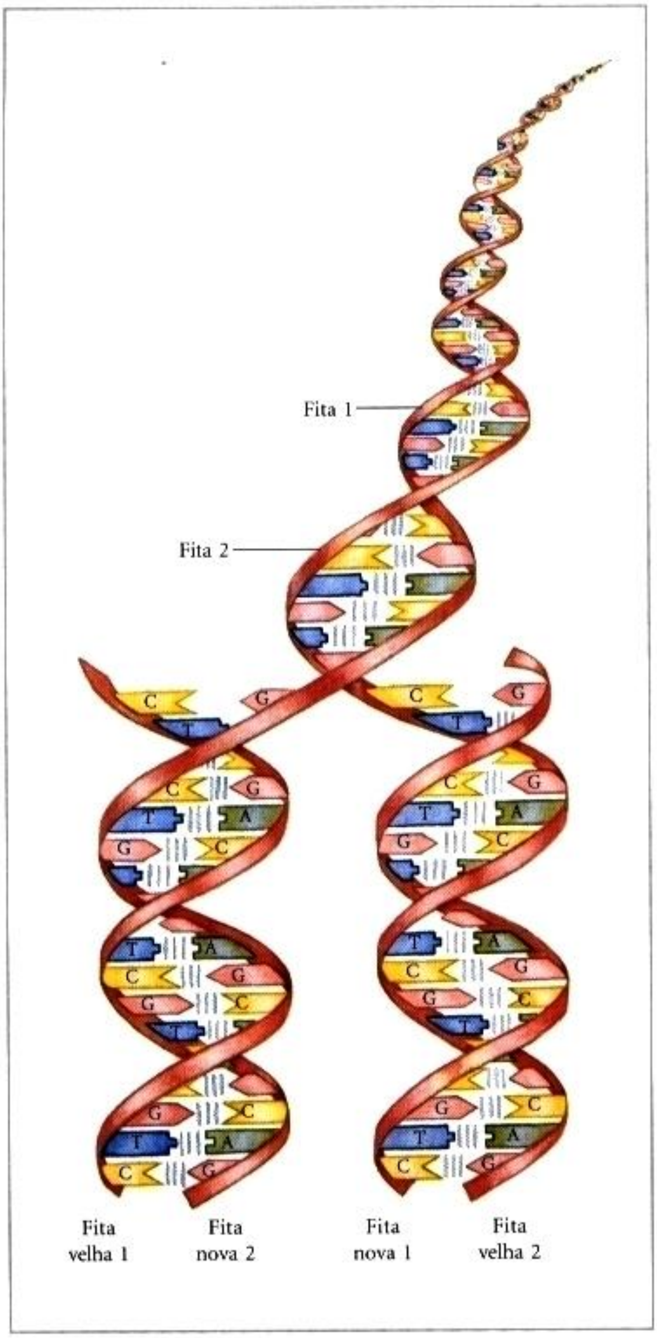


Figura 1-17 – Estrutura complementar do DNA. A estrutura complementar da fita dupla do DNA é responsável pela sua replicação acurada. O DNA é um polímero linear de quatro subunidades ligadas covalentemente, essas subunidades são os desoxirribonucleotídeos: desoxiadenilato (A), desoxiguanilato (G), desoxicitidilato (C) e desoxitimidilato (T). Devido à sua estrutura tridimensional, cada nucleotídeo tem a habilidade intrínseca de se associar, de forma altamente específica, a um outro nucleotídeo, porém de forma não-covalente: A sempre se associa ao seu nucleotídeo complementar T, e G ao seu complemento C. Na molécula em fita dupla do DNA, a seqüência de nucleotídeos em uma fita é **complementar** à seqüência na outra; em qualquer lugar que G ocorra na fita 1, C ocorrerá no ponto correspondente da fita 2. Onde quer que A ocorra na fita 1, T ocorrerá na fita 2. As duas fitas do DNA mantidas unidas por um grande número de pontes de hidrogênio (representadas aqui por linhas verticais azuis) entre os pares de nucleotídeos complementares enrolam-se umas nas outras para formar a dupla hélice do DNA. Na replicação do DNA, antes da divisão celular, as duas fitas do DNA original separam-se e são sintetizadas duas novas fitas, cada uma delas com uma seqüência de nucleotídeos complementar àquela da fita original. O resultado é duas moléculas de DNA em dupla hélice, cada uma delas idêntica ao DNA original.

do DNA, uma das duas fitas serve como molde para a montagem de outra fita de DNA, que é estruturalmente complementar. Antes que uma célula sofra divisão, as duas fitas de DNA separam-se e cada uma serve como molde para a síntese de uma fita complementar, gerando duas moléculas em dupla hélice idênticas, uma para cada célula filha. Se uma fita é danificada, a continuidade da informação é assegurada pela informação presente na outra fita.

- ✦ A informação genética está codificada na seqüência linear de quatro tipos de subunidades do DNA.
- ✦ A molécula em dupla hélice do DNA contém um molde interno para sua própria replicação e reparação.

Mudanças nas instruções hereditárias permitem a evolução

A despeito da fidelidade próxima da perfeição com que a replicação genética é feita, erros pouco freqüentes e irreparáveis, no processo de replicação, produzem mudanças na seqüência de nucleotídeos do DNA, representando uma **mutação** genética (Fig. 1-18). O mesmo efeito é obtido por reparação imperfeita dos danos causados a uma das fitas do DNA. As mutações podem alterar as instruções para a produção de componentes celulares. Muitas mutações são deletérias, ou até mesmo letais, para o organismo; podem, por exemplo, provocar a síntese de uma enzima defeituosa que não é capaz de catalisar uma reação metabólica essencial. Ocasionalmente, a mutação provoca uma melhor condição de um organismo ou célula para sobreviver no meio em que se encontra. A enzima mutante pode, por exemplo, ter adquirido especificidade ligeiramente diferente, de tal forma que ela é, agora, capaz de utilizar como reagente um certo composto, o qual a célula era previamente incapaz de metabolizar. Se uma população de células se encontra em um meio no qual o composto considerado era a única fonte de alimento disponível, a célula mutante terá uma vantagem sobre as demais que não sofreram a mutação (**tipo selvagem**). A célula mutante e sua progênie sobreviverão no novo ambiente, enquanto as células tipo selvagem ficarão desnutridas e serão eliminadas.

Variações genéticas ao acaso em indivíduos de uma população, combinadas com a seleção natural (sobrevivência dos indivíduos mais aptos em um meio desafiador ou que sofre mudanças), têm resultado na evolução de uma variedade enorme de organismos, cada um adaptado a viver em um determinado nicho ecológico.

A anatomia molecular revela relações evolucionárias

A bioquímica tem confirmado e estendido muito a teoria evolucionária. No século XVIII, o naturalista Carolus Linnaeus reconheceu as similitudes e as diferenças anatômicas entre os organismos vivos e forneceu uma base para estudar o relacionamento das espécies diferentes. Charles Darwin, no século XIX, deu-nos uma hipótese unificadora para explicar a filogenia dos organismos modernos — a origem de espécies diferentes a partir de um ancestral comum. A bioquímica, no século XX, começou a revelar a anatomia molecular das células de diferentes espécies — a seqüência de subunidades nos ácidos nucléicos e proteínas e as estruturas tridimensionais de moléculas individuais de ácidos nucléicos e proteínas.

Em nível molecular, a evolução é a emergência, no tempo, de diferentes seqüências de nucleotídeos no interior dos genes. Com novas seqüências genéticas sendo determinadas experimentalmente quase todos os dias, os bioquímicos têm um vasto e rico tesouro de evidências com o qual podem analisar as rela-

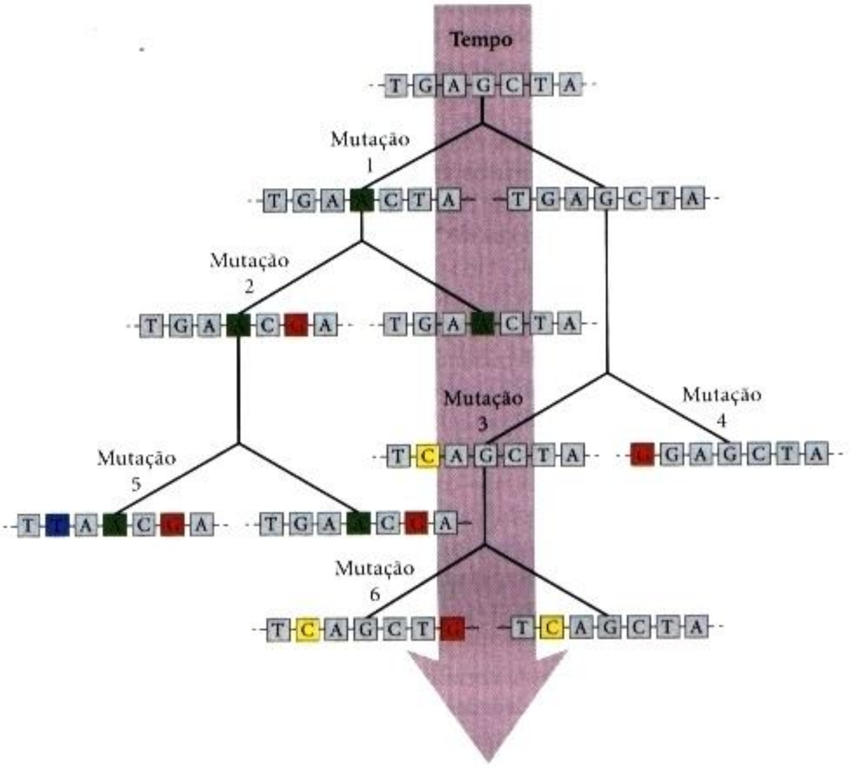


Figura 1-18 – Papel da mutação na evolução. Novas espécies biológicas, cada uma com uma seqüência de DNA única e original, resultam do acúmulo de mutações por um longo período de tempo. No alto está mostrado um pequeno segmento de um gene em um organismo progenitor hipotético. Com a passagem do tempo, mudanças na seqüência de nucleotídeos (mutações, indicadas aqui por quadros coloridos) ocorrem *uma de cada vez*, resultando em uma progênie com seqüências de DNA diferentes. Essa progênie mutante sofre, por sua vez, mutações ocasionais, produzindo sua própria progênie que difere por dois ou mais nucleotídeos da seqüência original. Quando duas linhagens se modificam muito por esse mecanismo, uma nova espécie foi criada.

ções evolucionárias e refinar a teoria da evolução. As seqüências de nucleotídeos de genomas inteiros (o genoma é o dote genético completo de um organismo) estão sendo determinadas (Tabela 1-1). As seqüências genômicas de um número de eubactérias e uma arquibactéria, um microrganismo eucariótico (*Saccharomyces cerevisiae*), e um animal multicelular (*Caenorhabditis elegans*) foram determinadas; seqüências de uma planta (*Arabidopsis thaliana*) e mesmo do *Homo sapiens* serão conhecidas logo. Com essas seqüências em mãos, comparações quantitativas, altamente detalhadas, entre as espécies proporcionarão esclarecimentos sobre o processo evolucionário. A filogenia molecular derivada das seqüências de genes é consistente com a filogenia clássica baseada em estruturas macroscópicas, mas em muitos casos mais precisa do que ela. Os mecanismos e as estruturas moleculares têm sido conservados durante o processo evolucionário, embora os organismos tenham divergido continuamente em nível anatômico macroscópico. Porém, em nível molecular, a unidade básica da vida é facilmente visível; mecanismos e estruturas moleculares cruciais são notavelmente similares desde o organismo mais simples até o mais complexo. A bioquímica tornou possível descobrir as características unificadoras comuns a todas as formas de vida.

A seqüência linear do DNA codifica proteínas com estruturas tridimensionais

A informação no DNA está codificada em uma seqüência linear (unidimensional) de unidades de nucleotídeos, mas a expressão dessa informação resulta em uma célula tridimensional. Essa mudança de uma para três dimensões ocorre em duas fases. Uma seqüência linear de desoxirribonucleotídeos no DNA codifica (por meio do RNA intermediário) a produção de uma proteína com uma seqüência linear correspondente de aminoácidos (Fig. 1-19). A proteína dobra-se sobre si mesma, numa forma tridimensional particular, ditada por sua seqüência de aminoácidos e estabilizada por interações não-covalentes. Embora a forma

Carolus Linnaeus
(1707-1778)

Charles Darwin
(1809-1882)

Tabela 1-1 – Alguns organismos cujos genomas foram completamente seqüenciados

Organismos	Tamanho do genoma (milhões de bases)	Interesse biológico
Mycoplasma pneumoniae	0,8	Causa pneumonia
Treponema pallidum	1,1	Causa sífilis
Borrelia burgdorferi	1,3	Causa doença de Lyme
Helicobacter pylori	1,7	Causa úlcera gástrica
Methanococcus jannaschii	1,7	Cresce a 85°C!
Haemophilus influenzae	1,8	Causa influenza bacteriana
Methanobacterium thermoautotrophicum	1,8	Membro da Arquea
Archaeoglobus fulgidus	2,2	Metanogênio de alta temperatura
Synechocystis sp.	3,6	Cianobactéria
Bacillus subtilis	4,2	Bactéria comum do solo
Escherichia coli	4,6	Algumas linhagens causam síndrome do choque tóxico
Saccharomyces cerevisiae	12,1	Eucarioto unicelular
Caenorhabditis elegans	97	Verme multicelular

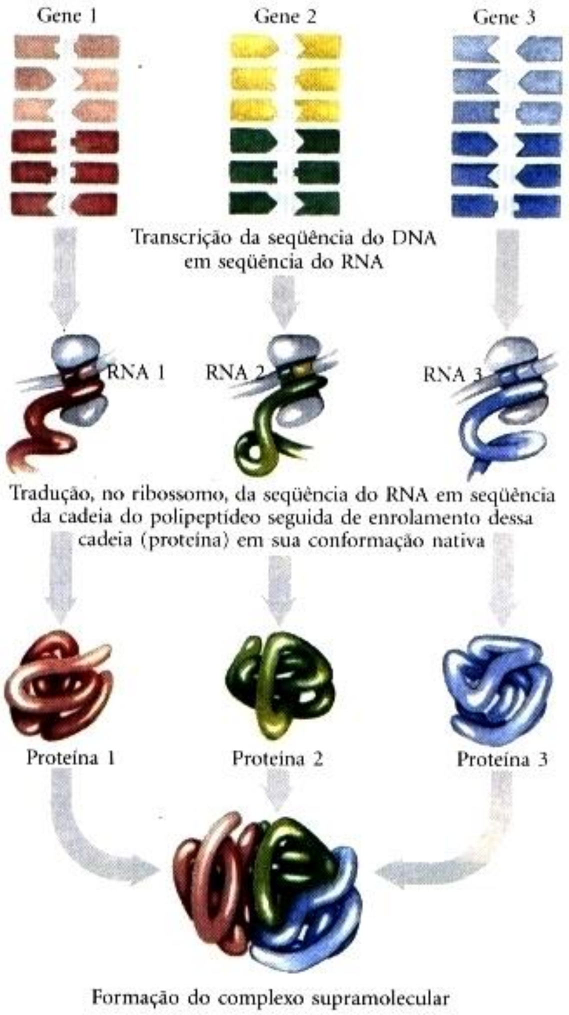

Gene 1
Gene 2
Gene 3
Transcrição da seqüência do DNA em seqüência do RNA
RNA 1
RNA 2
RNA 3
Tradução, no ribossomo, da seqüência do RNA em seqüência da cadeia do polipeptídeo seguida de enrolamento dessa cadeia (proteína) em sua conformação nativa
Proteína 1
Proteína 2
Proteína 3
Formação do complexo supramolecular

Figura 1-19 – As seqüências lineares de desoxirribonucleotídeos no DNA, arranjadas em unidades conhecidas por genes, são transcritas em moléculas de ácido ribonucléico (RNA) com seqüências de ribonucleotídeos complementares. As seqüências de RNA são então traduzidas em cadeias protéicas lineares, as quais se dobram espontaneamente assumindo suas formas tridimensionais nativas. As proteínas individuais, às vezes, associam-se com outras proteínas para formar complexos supramoleculares estabilizados por numerosas ligações fracas.

final da proteína dobrada seja ditada por uma seqüência de aminoácidos, o processo de enovelamento é auxiliado pelas proteínas que atuam como proteínas-guia moleculares ("chaperones moleculares") que evitam o enovelamento incorreto. A estrutura tridimensional precisa (**conformação nativa**) é crucial para a função da proteína, quer como catalisadora quer como elemento estrutural.

- A seqüência linear de aminoácidos em uma proteína leva à aquisição de uma estrutura tridimensional única e exclusiva por meio de um processo de automontagem.

Uma vez que uma proteína tenha se enrolado em sua conformação nativa, ela pode associar-se de forma não-covalente com outras proteínas ou com ácidos nucléicos ou com lipídios, para formar complexos supramoleculares como os cromossomos, os ribossomos e as membranas. Esses complexos são em muitos casos automontados. As moléculas individuais desses complexos têm sítios de ligação mútuos, específicos e de alta afinidade, e, dentro da célula, formam-se espontaneamente complexos funcionais.

- As macromoléculas individuais com afinidade específica por outras macromoléculas automontam-se em complexos supramoleculares.

Interações não-covalentes estabilizam as estruturas tridimensionais

As forças que dão estabilidade e especificidade às estruturas tridimensionais das macromoléculas e aos complexos supramoleculares são, em sua maior parte, interações não-covalentes. Essas interações, individualmente fracas, mas coletivamente fortes, incluem pontes de hidrogênio, interações iônicas entre grupos eletricamente carregados, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas entre grupos não-polares. As interações fracas são transientes; individualmente elas se formam e se rompem em pequenas frações de segundo. A natureza transiente das interações não-covalentes confere flexibilidade às macromoléculas, flexibilidade esta que é crítica para suas funções. Além disso, o grande número de interações não-covalentes em uma única macromolécula torna improvável que em dado instante todas as interações estejam rompidas; assim, as estruturas macromoleculares são estáveis ao longo do tempo.

- As estruturas biológicas tridimensionais combinam as propriedades de flexibilidade e de estabilidade.

A flexibilidade e a estabilidade da estrutura em dupla hélice da molécula do DNA são devidas à complementaridade das suas duas fitas e às numerosas interações fracas que existem entre elas. A flexibilidade dessas interações permite a separação das fitas durante a replicação do DNA (veja Fig. 1-17); a complementaridade da dupla hélice é essencial para a continuidade genética.

Interações não-covalentes são também centrais na especificidade e na eficiência catalítica das enzimas. As enzimas ligam os intermediários no estado de transição por meio de numerosas ligações fracas, as quais são, entretanto, precisamente orientadas. Como as interações fracas são flexíveis, o complexo sobrevive às distorções que ocorrem durante a transformação do reagente em produto.

A formação de interações não-covalentes fornece energia para a automontagem de macromoléculas pela estabilização das conformações nativas em detrimento das formas dobradas ao acaso. A conformação nativa de uma proteína é tal que as vantagens energéticas de formar interações fracas contrabalançam a tendência da cadeia protéica de assumir formas dobradas ao acaso. Dados uma seqüência linear específica de aminoácidos e um conjunto específico de condições (temperatura, condições iônicas, pH), uma proteína assumirá sua conformação nativa espontaneamente, sem a necessidade de um molde ou padrão para dirigir ou orientar o acoplamento.

As Raízes Físicas do Mundo Bioquímico

Podemos, agora, sumarizar os vários princípios da lógica molecular da vida:

- Uma célula viva é um sistema isotérmico de macromoléculas que se autocontém, automonta, auto-ajusta e autoperpetua, e que extrai energia livre do seu meio ambiente.
- A célula usa essa energia para manter-se em um estado estacionário dinâmico, distante do equilíbrio com o seu meio ambiente.
- As várias transformações químicas dentro das células são organizadas em uma rede de vias de reações, pro-

movidas a cada etapa por catalisadores específicos, chamados enzimas, os quais a própria célula produz. Uma grande economia das partes e dos processos é atingida pela regulação da atividade de enzimas-chave.

- A auto-replicação através de muitas gerações é conseguida pelo sistema linear de codificar a informação, que é auto-reparável. A informação genética, codificada como seqüências de subunidades de nucleotídeos no DNA e no RNA, especifica a seqüência de aminoácidos em cada proteína, o que, em última análise, determina a estrutura tridimensional e a função de cada proteína.
- Muitas interações fracas, não-covalentes, agindo cooperativamente, estabilizam as estruturas tridimensionais das biomoléculas e dos complexos supramoleculares, permitindo flexibilidade suficiente para ações biológicas.

As reações químicas e a regulação dos processos foram altamente refinadas durante a evolução. No entanto, não importa o quanto pareçam complexas, a maquinaria orgânica das células vivas funciona de acordo com um mesmo conjunto de leis que governa a operação das máquinas inanimadas.

Esse conjunto de princípios tem sido confirmado pelo estudo de organismos unicelulares, tais como a bactéria *E. coli*, os quais são excepcionalmente apropriados ao estudo bioquímico e genético. Embora os organismos multicelulares precisem resolver certos problemas não encontrados por organismos unicelulares, como a diferenciação do ovo fertilizado em tipos celulares especializados, ainda assim os mesmos princípios têm sido aplicados a eles. E aos seres humanos, com suas extraordinárias capacidades de pensamento, linguagem e criatividade, é possível que sejam aplicáveis essas afirmações simples e mecânicas? O recente passo do progresso bioquímico em direção ao entendimento de tais processos, como a regulação genética, a diferenciação celular, a comunicação entre as células e a função dos neurônios, tem sido extraordinariamente rápido e está em processo de aceleração. O sucesso dos métodos bioquímicos em resolver e redefinir esses problemas justifica a esperança de que as funções mais complexas dos organismos mais desenvolvidos serão, eventualmente, explicáveis em termos moleculares.

Os fatos relevantes da bioquímica são muitos; o estudante que aborda esse assunto pela primeira vez pode, ocasionalmente, senti-lo acima de suas forças. Talvez o mais encorajador no desenvolvimento da Biologia do século XX seja o conhecimento de que, apesar de toda a vasta diversidade do mundo biológico, há uma unidade e simplicidade básicas nos processos próprios da vida. Os princípios organizadores, a unidade bioquímica e a perspectiva evolucionária da diversidade, expostos no nível molecular, servirão como parâmetros de referência que auxiliarão o estudo da bioquímica.

Leitura Adicional

Asimov I. (1962) *Life and Energy: An Exploration of the Physical and Chemical Basis of Modern Biology.* Doubleday & Co., Inc., New York.

Uma descrição cativante do papel das transformações energéticas na biologia, escrita para o neófito inteligente.

Blum HF. (1968) *Time's Arrow and Evolution*, 3rd edn, Princeton University Press, Princeton, NJ.

Uma excelente discussão da maneira pela qual a segunda lei da termodinâmica tem influenciado a evolução biológica.

Darwin C. (1964) *On the Origin of Species. A Facsimile of the First Edition (published in 1859)*, Harvard University Press, Cambridge, MA.

Um dos mais influentes trabalhos científicos já publicados.

Dulbecco R. (1987) *The Design of Life*, Yale University Press, New Haven, CT.

Uma introdução excelente e incomum à biologia.

Fruton JS. (1972) *Molecules and Life. Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology.* Wiley Interscience, New York.

Essa série de ensaios descreve o desenvolvimento da bioquímica desde os estudos de Pasteur sobre a fermentação até os estudos atuais sobre o metabolismo e a transferência de informação.

Fruton JS. (1992) *A Skeptical Biochemist*, Harvard University Press, Cambridge, MA.

Jacob F. (1973) *The Logic of Life: A History of Heredity*, Pantheon Books, Inc., New York. Originalmente publicado em 1970 como *La logique du vivant: une histoire de l'hérédité*, Editions Gallimard, Paris.

Uma fascinante descrição histórica e filosófica da rota pela qual chegamos ao atual conhecimento molecular da vida.

Judson HF. (1979) *The Eighth Day of Creation: The Makers of the Revolution in Biology*, Jonathan Cape, London.

Um interessante e autêntico relato sobre a ascensão da bioquímica e da biologia molecular no século XX.

Kornberg A. (1987) The two cultures: chemistry and biology. *Biochem.* **26**, 6888-6891.

A importância da aplicação de ferramentas químicas aos problemas biológicos, descritos por um experimentador eminente.

Mayr E. (1997) *This is Biology: The Science of the Living World*, Belknap Press, Cambridge, MA.

Uma história do desenvolvimento da ciência, com ênfase especial na evolução darwiniana, por um eminente seguidor da escola de Darwin.

Monod J. (1971) *Chance and Necessity*, Alfred A. Knopf, Inc., New York (Versão brochura da Vintage Books, New York, 1972). Originalmente publicado em 1970 como *Le hasard et la nécessité*, Editions du Seuil, Paris.

Uma exploração das implicações filosóficas do conhecimento biológico.

Schrödinger E. (1944) *What is Life?* Cambridge University Press, New York (Reimpresso, 1956, em *What Is Life? and Other Scientific Essays*, Doubleday Anchor Books, Garden City, NY).

Uma visão provocativa da biologia, escrita por um eminente físico-químico.

CAPÍTULO 2

Células

Células são as unidades estruturais e funcionais de todos os organismos vivos. Os menores organismos consistem de células únicas e são microscópicos, enquanto os organismos maiores são multicelulares. O corpo humano, por exemplo, contém pelo menos 10^{14} células. Organismos unicelulares são encontrados em grande variedade e virtualmente por toda parte, de ambientes desde a Antártica até fontes de águas quentes e o recesso interno dos organismos maiores. Organismos multicelulares contêm muitos tipos de diferentes células, que variam no tamanho, na forma e na função especializada. Independentemente da complexidade e do tamanho do organismo, cada uma de suas células retém alguma individualidade e independência.

Apesar das suas muitas diferenças, células de todas as espécies compartilham certas características estruturais (Fig. 2-1).

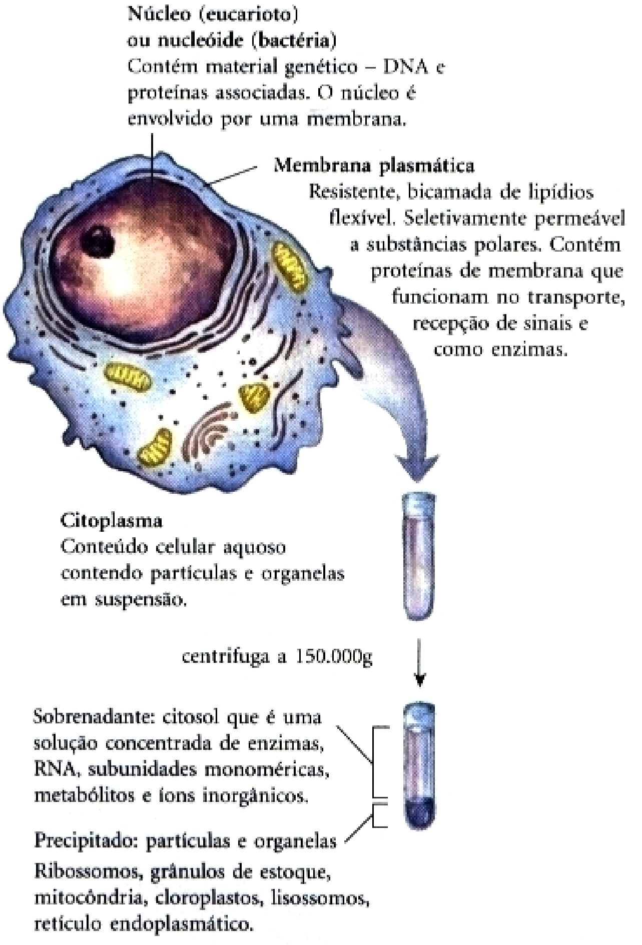

Núcleo (eucarioto)
ou nucleóide (bactéria)
Contém material genético – DNA e proteínas associadas. O núcleo é envolvido por uma membrana.
Membrana plasmática
Resistente, bicamada de lipídios flexível. Seletivamente permeável a substâncias polares. Contém proteínas de membrana que funcionam no transporte, recepção de sinais e como enzimas.
Citoplasma
Conteúdo celular aquoso contendo partículas e organelas em suspensão.
centrifuga a 150.000g
Sobrenadante: citosol que é uma solução concentrada de enzimas, RNA, subunidades monoméricas, metabólitos e íons inorgânicos.
Precipitado: partículas e organelas
Ribossomos, grânulos de estoque, mitocôndria, cloroplastos, lisossomos, retículo endoplasmático.

Figura 2-1 – Características universais das células vivas. Todas as células têm um núcleo ou nucleóide, uma membrana plasmática e um citoplasma. O citosol é operacionalmente definido como aquela parte do citoplasma que permanece no sobrenadante depois da centrifugação de um extrato celular a 150.000g por 1h.

A **membrana plasmática** define a periferia da célula, separando o seu conteúdo da circunvizinhança. Ela é composta de grande número de moléculas de lipídios e proteínas, mantidas juntas principalmente por interações hidrofóbicas não-covalentes (pág. 14), formando uma bicamada hidrofóbica fina, resistente e flexível, em volta da célula. A membrana é uma barreira à livre passagem de íons inorgânicos e à maioria de outros compostos polares ou carregados. Proteínas transportadoras da membrana plasmática permitem a passagem de certos íons e moléculas. Outras proteínas da membrana incluem os receptores, que transmitem sinais do exterior para o interior da célula, e as enzimas, que participam de reações em vias associadas a membranas.

Pelo fato de os lipídios individuais e as proteínas da membrana plasmática não serem ligados covalentemente, a estrutura inteira é surpreendentemente flexível, permitindo alterações na forma e no tamanho da célula. À medida que uma célula cresce, moléculas de lipídios e proteínas recém-sintetizadas são inseridas na sua membrana plasmática; a divisão celular produz duas células, cada uma com sua própria membrana. Crescimento e fissão ocorrem sem perda da integridade da membrana. Numa reversão do processo de fissão, duas superfícies de membranas separadas podem-se fundir, também sem perda da integridade. Fusão e fissão da membrana são centrais aos mecanismos de transporte para o interior e o exterior das células, conhecidos como endocitose e exocitose, respectivamente.

O volume interno limitado pela membrana plasmática, o **citoplasma**, é composto de uma solução aquosa, o **citosol**, e de uma variedade de partículas insolúveis suspensas (Fig. 2-1). O citosol é uma solução aquosa altamente concentrada com uma composição complexa e uma consistência gelatinosa. Dissolvidas no citosol estão muitas enzimas e as moléculas de RNA que as codificam; as subunidades monoméricas (aminoácidos e nucleotídeos) a partir das quais essas macromoléculas são montadas; centenas de pequenas moléculas orgânicas chamadas de **metabólitos**, intermediários nas vias biossintetizantes e degradativos; as **coenzimas**, compostos de peso molecular intermediário (M_r 200 a 1.000) que são participantes essenciais em muitas reações catalisadas por enzimas; e os íons inorgânicos.

Entre as partículas suspensas no citosol estão os complexos supramoleculares e, em quase todas as células não bacterianas, uma variedade de organelas limitadas por membrana onde está localizada a maquinaria metabólica especializada. **Ribossomos**, pequenas partículas de 18 a 22μm de diâmetro (1mm é igual a 10^{-9}m) as quais são compostas acima de 50 diferentes moléculas de proteínas e RNA, são os locais onde ocorre a síntese protéica. Os ribossomos envolvidos na síntese das proteínas, freqüentemente, ocorrem em agregados chamados de **polissomos** (polirribossomos), mantidos juntos por uma fita de RNA mensageiro. Também estão presentes no citoplasma de muitas células os grânulos que contêm nutrientes armazenados, como o amido e a gordura.

Todas as células vivas possuem em pelo menos uma parte da sua vida um **núcleo** ou um **nucleóide**, onde o **genoma** (o conjunto completo de genes, compostos de DNA) é armazenado e replicado. As moléculas de DNA são sempre muito mais longas do que as próprias células e são firmemente dobradas e empacotadas dentro do núcleo ou nucleóide como complexos supramoleculares de DNA com proteínas específicas. O nucleóide bacteriano não é separado do citoplasma por uma membrana, mas nos organismos superiores o material nuclear é envolto por uma membrana dupla, o envelope nuclear. As células com envelope nuclear são chamadas de **eucariotos** (do grego *eu*, "verdadeiro", e *karyon*, "núcleo"); aquelas sem envelope nuclear — células bacterianas — são os **procariotos** (do grego *pro*, "antes").

Ao contrário das bactérias, os eucariotos possuem uma variedade de outras organelas limitadas por membrana no seu citoplasma, incluindo mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomos e vacúolos (organelas encontradas em células de animal e plantas, respectivamente), e nas células fotossintetizantes, os cloroplastos.

Neste capítulo revisaremos rapidamente as relações evolucionárias entre algumas células e organismos comumente estudados e as características estruturais que distinguem as células de vários tipos. Nosso foco principal estará nas células eucarióticas. Também serão discutidos rapidamente os parasitas celulares conhecidos como vírus.

Dimensões Celulares

A maioria das células é de tamanho microscópico, invisível ao olho desarmado. Células animais e de plantas possuem tipicamente de 5 a 100μm de diâmetro e muitas bactérias têm apenas 1 a 2μm de comprimento (1μm é igual a 10^{-6}m).

O que limita a dimensão de uma célula? O limite inferior é provavelmente estabelecido pelo número mínimo de cada uma das diferentes biomoléculas requeridas pela célula. As menores células completas, certas bactérias conhecidas como micoplasma, possuem 300nm de diâmetro e têm um volume de aproximadamente 10^{-14}mL. Um único ribossomo possui cerca de 20nm na sua maior dimensão, de forma que alguns ribossomos ocupam uma fração substancial do volume da célula. Numa célula, uma solução 1μM de um composto (uma concentração típica para alguns metabólitos menores) representa apenas 6.000 moléculas.

O limite superior do tamanho celular é provavelmente estabelecido pela velocidade de difusão das moléculas dos solutos nos sistemas aquosos. Uma célula bacteriana que dependa de reações que consumam oxigênio para a produção de energia (uma célula **aeróbica**) deve obter oxigênio molecular (O_2) do meio circundante pela **difusão** através da sua membrana plasmática. A célula é tão pequena e a relação da área da sua superfície com o seu volume é tão grande, que todas as partes do citoplasma são facilmente alcançadas pelo O_2 que se difunde dentro da célula. À medida que o tamanho de uma célula aumenta, sua razão superfície/volume diminui, até que o metabolismo consuma O_2 mais rápido do que a difusão possa suprir. O metabolismo aeróbico torna-se, portanto, impossível à medida que o tamanho celular aumenta além de um certo ponto, impondo um limite superior teórico ao tamanho da célula aeróbica.

Há exceções interessantes a essa generalização de que a célula deva ser pequena. A alga verde *Nitella* possui células gigantes de vários centímetros de comprimento. Para garantir a chegada de nutrientes, de metabólitos e da informação genética (RNA) para todas as suas partes, cada célula é vigorosamente "agitada" por correntes citoplasmáticas ativas (veja Fig. 2-18). A forma de uma célula também pode ajudar a compensar o seu longo tamanho. Uma esfera lisa possui a menor razão possível superfície/volume para um dado volume. Muitas células grandes, embora aproximadamente esféricas, possuem superfície altamente convoluta (Fig. 2-2a), criando grandes áreas de superfície para o mesmo volume e, portanto, facilitando a captação de combustíveis e nutrientes, além da liberação de produtos de excreção para o meio circundante. Outras células (neurônios, por exemplo) possuem uma elevada razão superfície/volume pelo fato de serem longas e delgadas, em forma de estrela ou altamente ramificadas (Fig. 2-2b), em vez de esféricas.

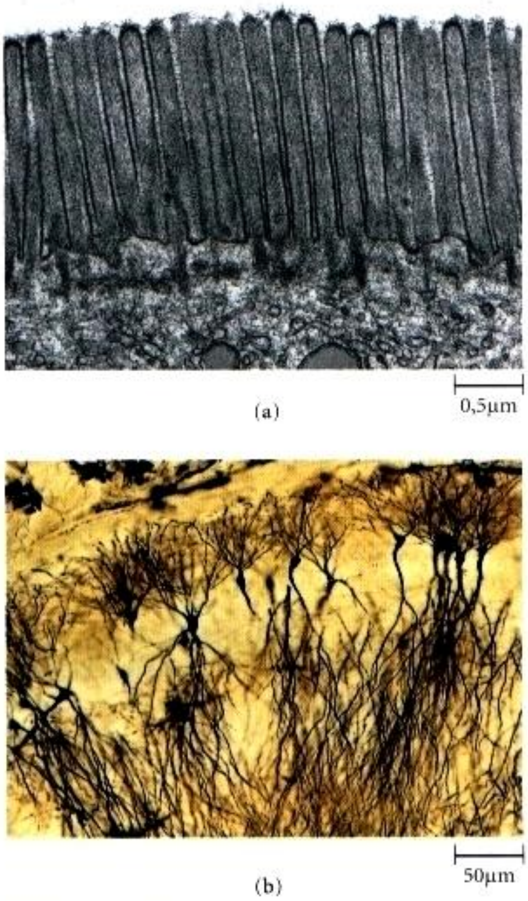


Figura 2-2 – Convoluções da membrana plasmática, ou extensões finas e longas do citoplasma, aumentam a razão entre a superfície e o volume das células. (**a**) Células da mucosa intestinal (o revestimento interno do intestino delgado); a membrana plasmática revestindo a luz intestinal apresenta dobraduras com microvilosidades, aumentando a área para a absorção dos nutrientes pelo intestino. (**b**) Neurônios do hipocampo do cérebro de rato possuem vários milímetros de comprimento, mas suas longas extensões (axônios) têm apenas 10nm de espessura.

Células e Tecidos Usados em Estudos Bioquímicos

Pelo fato de todas as células vivas terem-se desenvolvido dos mesmos progenitores, elas compartilham certas semelhanças fundamentais. Estudos bioquímicos cuidadosos de apenas alguns tipos de células, embora diferentes nas minúcias bioquímicas e variados na aparência superficial, devem entretanto gerar princípios gerais aplicáveis a todas as células e organismos. O efervescente conhecimento em biologia nos últimos 150 anos tem apoiado essa proposição repetitivamente. Certas células, tecidos e organismos têm-se mostrado mais apropriados ao estudo experimental do que outros. O conhecimento em bioquímica é primariamente derivado de alguns organismos e tecidos representativos como a bactéria *Escherichia coli*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, as algas fotossintetizantes, tais como *Chlamydomonas*, as folhas de espinafre, o fígado de rato e o músculo esquelético de vários vertebrados. Alguns estudos bioquímicos focalizam o isolamento, a purificação e a caracterização de componentes celulares; outras pesquisas investigam as vias metabólicas e genéticas das células vivas.

Um experimentador idealmente começa o isolamento de enzimas e de outros componentes celulares com uma fonte de material homogêneo e abundante. O componente de interesse (como uma enzima ou ácido nucléico) freqüentemente representa apenas uma fração minúscula do material total, e gramas ou mesmo quilogramas do material inicial são necessários para se obter apenas alguns miligramas do componente purificado. Uma fonte homogênea de uma enzima ou ácido nucléico, em que todas as células sejam bioquímica e geneticamente idênticas, não deixa nenhuma dúvida sobre que tipo celular produz o componente purificado e torna mais seguro extrapolar os resultados dos estudos *in vitro* para a situação *in vivo*. Uma cultura em larga escala de células bacterianas ou protistas (*E. coli, S. cerevisiae* ou *Chlamydomonas*, por exemplo), todas derivadas por divisão do mesmo ancestral e portanto geneticamente idênticas, preenche o requisito de uma fonte homogênea e abundante. Tecidos individuais de animais de laboratório (fígado de rato, cérebro de porco, músculo de coelho) são fontes abundantes de células semelhantes, embora não idênticas. Algumas células animais e de plantas proliferam em culturas de tecidos, produzindo populações de células idênticas (clones) em quantidades apropriadas para a análise bioquímica.

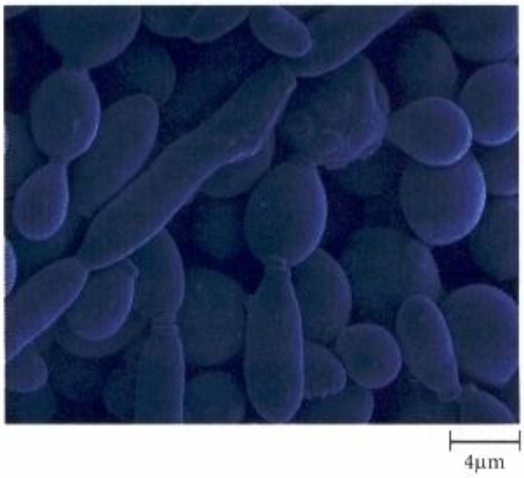
Mutantes genéticos, nos quais um defeito num único gene produz uma proteína defeituosa, a qual causa um defeito funcional específico na célula ou organismo, são extremamente úteis no estabelecimento de que um certo componente celular é essencial para uma função celular particular. Pelo fato de ser tecnicamente muito mais fácil produzir e detectar mutantes em bactérias e na levedura, esses organismos (*E. coli* e *S. cerevisiae*, por exemplo) têm sido os alvos experimentais favoritos para os geneticistas bioquímicos.

Uma vez que o gene para uma proteína tenha sido isolado, pode-se muitas vezes ser inserido em uma célula bacteriana ou levedura, as quais atuam como fábricas biológicas, superproduzindo a proteína. Com técnicas de engenharia genética, os experimentadores podem introduzir mutações específicas em certos genes e determinar seus efeitos sobre a estrutura e função da proteína.

Um organismo que seja fácil de ser cultivado no laboratório, com um tempo de geração curto, oferece vantagens significativas para a pesquisa bioquímica. Um organismo que requeira apenas umas poucas moléculas precursoras simples no seu meio de crescimento pode ser cultivado na presença de um precursor radioativamente marcado e este ter o seu destino metabólico convenientemente traçado, seguindo-se a incorporação dos átomos radioativos nos seus produtos metabólicos. O curto tempo de geração dos microrganismos (minutos ou horas) permite ao investigador seguir o precursor marcado ou um defeito genético através de muitas gerações em alguns dias. Nos organismos superiores, com tempo de geração de meses ou anos, isso é praticamente impossível.

Alguns tecidos altamente especializados dos organismos multicelulares são notavelmente enriquecidos de algum componente particular relacionado à sua função especializada. Para os estudos sobre funções ou componentes específicos, os bioquímicos comumente escolhem o tecido especializado para os sistemas experimentais, por exemplo, o músculo esquelético dos vertebrados é uma fonte rica de actina e miosina; as células secretórias do pâncreas contêm altas concentrações de retículo endoplasmático rugoso; as células do espermatozóide são ricas em DNA, o fígado contém altas concentrações de muitas enzimas das vias biossintetizantes; as folhas do espinafre contêm grandes quantidades de cloroplastos.

Uma célula de *Escherichia coli* em divisão.



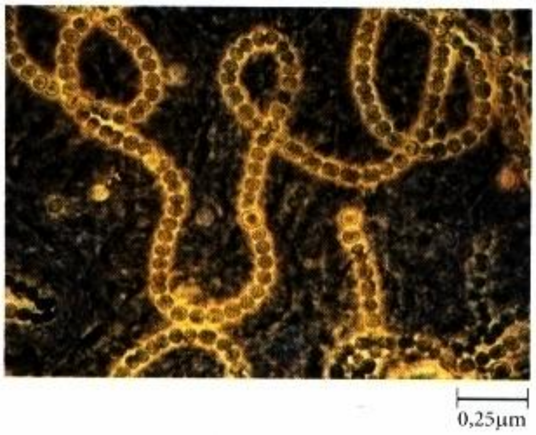
Células de *Saccharomyces cerevisae* (levedura) em divisão.

Algumas vezes, a simplicidade da estrutura ou função torna uma célula ou organismo particular atraente como sistema experimental. Para o estudo da estrutura e função da membrana plasmática, o eritrócito maduro (glóbulo vermelho) tem sido um favorito, porque ele não tem membranas internas para complicar a purificação da membrana plasmática. Alguns vírus bacterianos (bacteriófagos) possuem poucos genes. Suas moléculas de DNA são, portanto, menores e mais simples do que aquelas do homem ou do milho e mostrou-se ser mais fácil estudar a replicação nesses vírus do que nos cromossomos humanos ou do milho. Provou-se ser mais fácil estudar a replicação do DNA com esses vírus do que com cromossomos eucarióticos, porque, quando um vírus infecta a célula bacteriana, acontece uma rápida e sincrônica síntese de DNA, muitas vezes acompanhada por um aumento dos níveis das enzimas da replicação do DNA.

A descrição bioquímica das células vivas neste livro é uma composição baseada no estudo de muitos tipos de células. O bioquímico deve sempre ser cauteloso na generalização de resultados obtidos em estudo de células, tecidos ou organismos selecionados e no relacionar o que é observado *in vitro* com o que acontece dentro da célula viva.

Evolução e Estrutura das Células Procarióticas

Dois grandes grupos de procariotos podem ser distinguidos em solo bioquímico: a **arqueobactéria** (do grego *archē*, "origem") e a **eubactéria** (do grego *eu*, "real"). A eubactéria habita o solo, a superfície das águas e os tecidos de outros organismos vivos ou em decomposição. A mais comum e mais bem estudada bactéria, incluindo a *E. coli*, são as eubactérias. As arqueobactérias foram mais recentemente descobertas e menos caracterizadas bioquimicamente. A maioria habita os ambientes mais extremos — águas salgadas, águas quentes, pântanos e regiões profundas dos oceanos. Evidências disponíveis sugerem que a arqueobactéria e a eubactéria divergiram precocemente na evolução e constituem dois reinos ou domínios separados, algumas vezes chamados Bactéria e Arqueo. Todos os organismos eucariotos que constituem o terceiro domínio, Eucario, surgiram da mesma ramificação que deram origem ao Arqueo; arqueobactérias todavia estão mais proximamente relacionadas com eucariotos do que com as eubactérias. Com a disponibilidade da completa seqüência genômica para a arqueobactéria (como por exemplo a *Methanococcus jannaschii*) e para a eubactéria (*E. coli*), a extensão da divergência entre esses domínios de vida tornou-se completamente aparente: menos da metade dos genes da *M. jannaschii* possui homólogos reconhecidos em *E. coli*. Além disso, os genes que codificam as proteínas requeridas para a replicação do DNA, a transcrição do RNA e a síntese protéica na arqueobactéria *M. jannaschii* são em geral do mesmo tipo dos encontrados em eucariotos e distintamente diferentes dos envolvidos no mesmo processo em eubactéria.



Nostoc sp., uma cianobactéria fotossintetizante. Esta simples micrografia mostra longos colares das células individuais arredondadas.

Dentro dos domínios de Bactéria e Arqueo estão subgrupos distinguíveis pelos hábitats nos quais eles vivem. Em hábitats aeróbicos com um abundante suprimento de oxigênio, alguns organismos residentes vivem por meio do metabolismo aeróbico; os seus processos catabólicos terminam, em última análise, na transferência de elétrons das moléculas combustíveis para o oxigênio. Outros ambientes são **anaeróbicos**, virtualmente desprovidos de oxigênio, e os microrganismos adaptados a esses ambientes conduzem o catabolismo sem ele. Essas bactérias transferem elétrons para nitrato (formando N_2), sulfato (formando H_2S) ou CO_2 (formando metano, CH_4). Muitos organismos que tiveram origem em ambientes anaeróbicos são obrigatoriamente anaeróbios; eles morrem quando expostos ao oxigênio.

Os organismos podem ser divididos em duas vastas categorias, segundo suas fontes de energia: **fototrópicos** (do grego *trophē*, "alimentação") luz solar como fonte, enquanto os **quimiotrópicos** obtêm sua energia a partir da oxidação de um combustível. Os fototrópicos podem ser ainda divididos naqueles que podem obter todo o carbono necessário a partir do CO_2 (**autotróficos**) e naqueles que requerem nutrientes orgânicos (**heterotróficos**). Nenhum quimiotrópico pode obter seus átomos de carbono exclusivamente a partir do CO_2 (isto é, não há autotróficos nesse grupo), mas os quimiotrópicos podem ser classificados ainda por diferentes critérios: se os combustíveis que eles oxidam são inorgânicos (**litotróficos**) ou orgânicos (**organotróficos**). A maioria dos organismos conhecidos pertence a estas quatro grandes categorias: autotróficos ou heterotróficos entre os fotossintetizantes e litotróficos ou organotróficos entre os oxidantes químicos (Fig. 2-3). Então os procariotos têm várias maneiras de obter carbono e energia. A *E. coli*, por exemplo, é um quimiorganoeterotrófico, requer compostos orgânicos do seu ambiente como combustível e como fonte de carbono. As cianobactérias são fotolitoautotróficas, elas usam a luz solar como fonte de energia e convertem CO_2 para as biomoléculas.

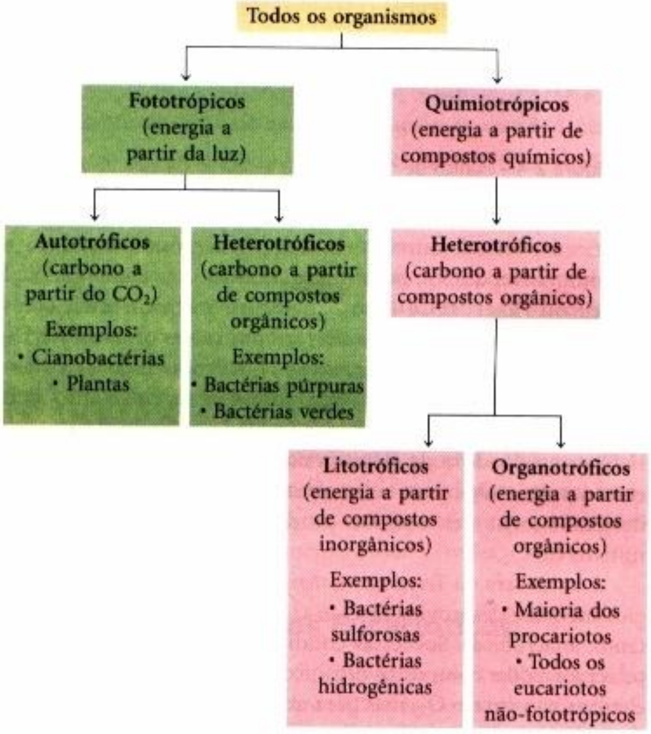

Todos os organismos
Fototrópicos (energia a partir da luz)
Quimiotrópicos (energia a partir de compostos químicos)
Autotróficos (carbono a partir do CO₂)
Exemplos:
• Cianobactérias
• Plantas
Heterotróficos (carbono a partir de compostos orgânicos)
Exemplos:
• Bactérias púrpuras
• Bactérias verdes
Heterotróficos (carbono a partir de compostos orgânicos)
Litotróficos (energia a partir de compostos inorgânicos)
Exemplos:
• Bactérias sulforosas
• Bactérias hidrogênicas
Organotróficos (energia a partir de compostos orgânicos)
Exemplos:
• Maioria dos procariotos
• Todos os eucariotos não-fototrópicos

Figura 2-3 – Os organismos podem ser classificados de acordo com sua fonte de energia (luz solar ou compostos químicos oxidáveis) e sua fonte de carbono para a síntese de material celular.

Como mostra a Figura 2-4, as células iniciais provavelmente surgiram há 3,5 bilhões ($3,5 \times 10^9$) de anos, numa mistura rica de compostos orgânicos, a "sopa primordial", dos tempos pré-bióticos; eles eram quase certamente quimioeterotróficos. Os compostos orgânicos requeridos foram originalmente sintetizados a partir desses componentes da atmosfera terrestre inicial, como o CO, CO_2, N_2 e CH_4, pelas ações não biológicas do calor vulcânico e luminoso (Capítulo 3). Os heterotróficos primitivos gradualmente adquiriram a capacidade de obter sua energia de certos compostos do seu ambiente e usar essa energia para sintetizar cada vez mais as suas próprias moléculas precursoras; tornando-se, portanto, menos dependentes das fontes externas dessas moléculas. Um evento evolucionário muito

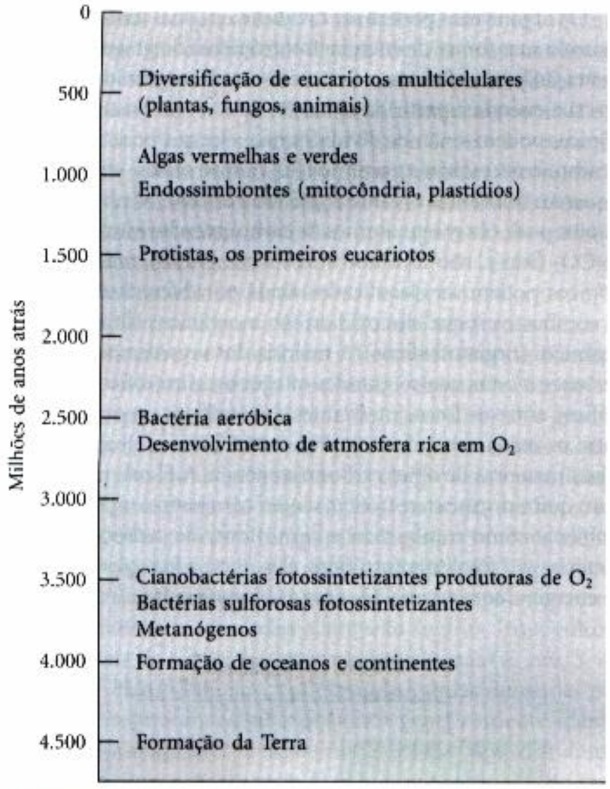


Figura 2-4 – Pontos de referência na evolução da vida na Terra.

significativo foi o desenvolvimento de pigmentos capazes de captar a luz visível do Sol, permitindo a célula usar a energia para reduzir ou "fixar" o CO_2 em compostos orgânicos mais complexos. O doador original de elétrons para esses organismos **fotossintetizantes** foi provavelmente o H_2S, produzindo o elemento enxofre ou sulfato (SO_4^{2-}) como subproduto, entretanto mais tarde as células desenvolveram a capacidade enzimática para usar H_2O como doadora de elétrons nas reações fotossintetizantes, eliminando o O_2 como subproduto. As cianobactérias são os descendentes modernos desses produtores fotossintetizantes primitivos do O_2.

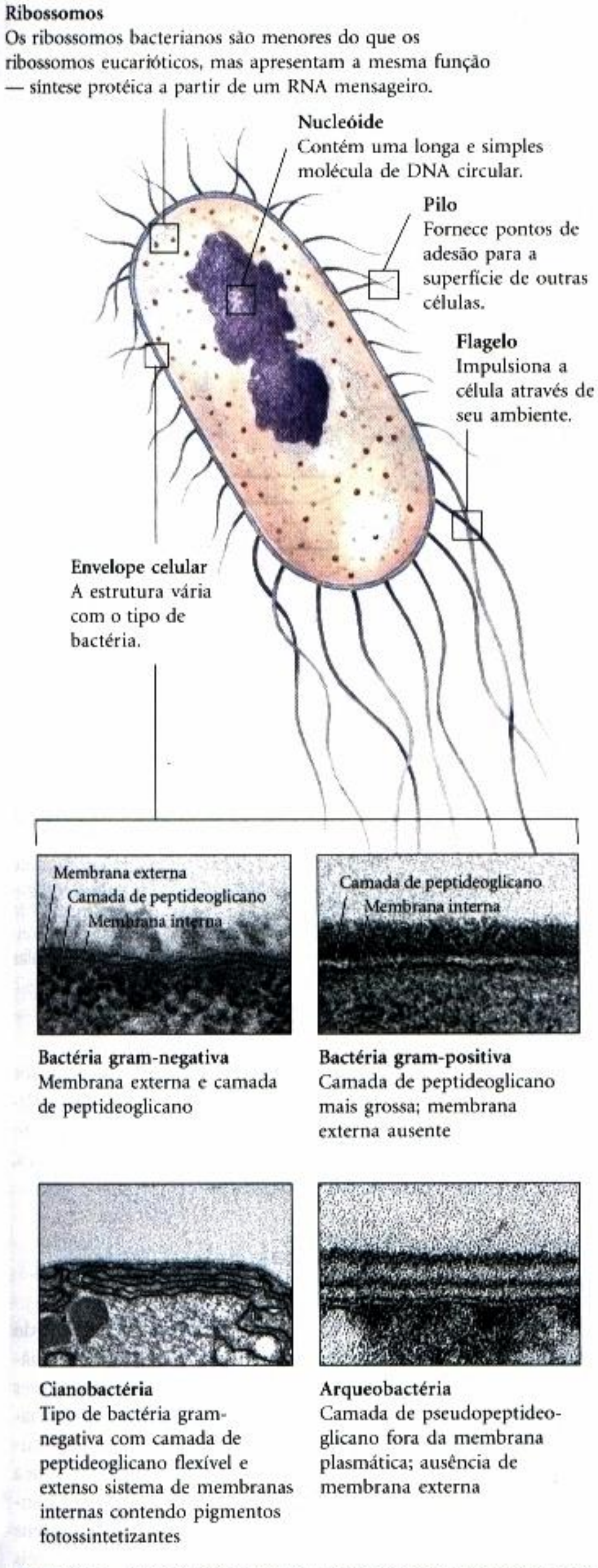
A atmosfera da Terra nos estágios iniciais da evolução biológica era quase desprovida de O_2 e as primeiras células foram, portanto, anaeróbicas. Sob essas condições, os quimioeterotróficos puderam oxidar compostos orgânicos para CO_2 pela passagem de elétrons não para o O_2, mas para aceptores tais como SO_4^{2-}, produzindo H_2S como produto. Com o surgimento das bactérias fotossintetizantes, produtoras de O_2, a atmosfera terrestre tornou-se progressivamente mais rica em O_2, um poderoso veneno oxidante e mortal para os anaeróbios adaptados ao moderado ambiente. Respondendo à pressão evolucionária do então chamado "holocausto do oxigênio", algumas linhagens de microrganismos deram origem aos aeróbios que obtinham energia pela passagem de elétrons a partir de moléculas combustíveis para o oxigênio. Pelo fato de as transferências de elétrons a partir de moléculas orgânicas para o O_2 produzirem uma grande quantidade de energia (elas são muito exergônicas, veja Capítulo 1), os organismos aeróbicos desfrutam uma vantagem energética sobre sua contrapartida anaeróbica, quando ambos competem num ambiente contendo O_2. Essa vantagem se traduz pela predominância de organismos aeróbicos nos ambientes ricos em O_2.

As bactérias modernas habitam quase todos os nichos ecológicos na biosfera, há espécies de bactérias capazes de usar praticamente todo tipo de composto orgânico como fonte de carbono e energia. Bactérias fotossintetizantes em águas marinhas ou frescas captam energia solar e a usam para gerar carboidratos e todos os outros constituintes celulares, os quais são por outro lado usados como alimento pelas outras formas de vida. Um potencial limitante para crescer na reserva da biosfera é a disponibilidade de compostos contendo nitrogênio e aqui as bactérias são uma ligação essencial na rede global de alimentos. Umas poucas linhagens de bactérias, chamadas de **diazotróficas**, são os únicos organismos sobre a Terra que podem converter metabolicamente o nitrogênio atmosférico (N_2) para compostos biologicamente necessários, em um processo conhecido como **fixação de nitrogênio**. Reações impulsionadas pela luminosidade e a indústria fertilizante também contribuem significativamente para o balanço global de nitrogênio fixado. Entretanto, estas últimas fontes de nitrogênio biodisponível não são necessariamente as fontes imediatas de suprimento para a biosfera. A maioria dos compostos de nitrogênio captados pelos organismos é reciclada a partir do rejeito orgânico e aqui, outra vez, as bactérias exercem um papel essencial na rede global, atuando como últimos consumidores, degradando o material orgânico de plantas e animais mortos e reciclando os produtos finais para o ambiente.

A *Escherichia coli* é a célula procariótica mais bem estudada

As células bacterianas compartilham certas características estruturais comuns, mas também apresentam especializações grupo-específicas (Fig. 2-5). A *E. coli* é um habitante usualmente inofensivo do trato intestinal dos seres humanos e de muitos outros mamíferos. A célula da *E. coli* tem cerca de 2µm de comprimento e um pouco menos de 1µm de diâmetro, tem uma membrana externa protetora e uma membrana plasmática interna que envolve o citoplasma e o nucleóide. Entre as membranas interna e externa há uma fina, mas forte, camada de peptideoglicanos (polímeros de açúcar unidos por ligações cruzadas de aminoácidos), que fornece à célula sua forma e rigidez. A membrana plasmática e as camadas externas constituem o **envelope celular**. Diferenças no envelope celular são responsáveis pelas afinidades diferentes para o corante violeta de genciana que é a base do corante de Gram; as bactérias gram-positivas retêm o corante, e as bactérias gram-negativas não. A membrana externa da *E. coli*, como a de outras eubactérias gram-negativas, é semelhante à membrana plasmática na estrutura, mas é diferente na composição. Nas bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo) não há membrana externa e a camada de peptideoglicanos que envolve a membrana plasmática é muito mais espessa do que nas bactérias gram-negativas. Na Arqueo, a rigidez é conferida por um tipo diferente de ligações cruzadas de polímero de açúcar ("pseudopeptideoglicano"). As membranas plasmáticas das eubactérias consistem de uma fina bicamada de moléculas de lipídios penetrada por proteínas. As membranas das arqueobactérias possuem uma arquitetura semelhante, embora os seus lipídios difiram dos das eubactérias.

A membrana plasmática contém proteínas capazes de transportar certos íons e compostos para dentro da célula e transportar produtos e resíduos para fora. Também na membrana plasmática da maioria das eubactérias estão as proteínas transportadoras de elétrons (citocromos), essenciais na formação do ATP a partir do ADP (Capítulo 1). Na bactéria fotossintetizante, as membranas internas derivadas da membrana plasmática contêm clorofila e outros pigmentos que captam a luz.



Ribossomos
Os ribossomos bacterianos são menores do que os ribossomos eucarióticos, mas apresentam a mesma função — síntese protéica a partir de um RNA mensageiro.

Nucleóide
Contém uma longa e simples molécula de DNA circular.

Pilo
Fornece pontos de adesão para a superfície de outras células.

Flagelo
Impulsiona a célula através de seu ambiente.

Envelope celular
A estrutura varia com o tipo de bactéria.

Bactéria gram-negativa
Membrana externa e camada de peptideoglicano

Bactéria gram-positiva
Camada de peptideoglicano mais grossa; membrana externa ausente

Cianobactéria
Tipo de bactéria gram-negativa com camada de peptideoglicano flexível e extenso sistema de membranas internas contendo pigmentos fotossintetizantes

Arqueobactéria
Camada de pseudopeptideoglicano fora da membrana plasmática; ausência de membrana externa

Figura 2-5 – Características estruturais comuns das células bacterianas. Por causa das diferenças na estrutura da parede celular, algumas eubactérias (bactérias gram-positivas) retêm o corante do Gram e outras não (bactérias gram-negativas). A *E. coli* é gram-negativa. As cianobactérias são também eubactérias, mas se distinguem pelo seu extenso sistema de membrana interna, em que estão localizados os pigmentos fotossintetizantes. Embora a parede celular de arquebactéria e a de eubactéria gram-positiva pareçam semelhantes à microscopia eletrônica, as estruturas da membrana de lipídios e dos polissacarídeos da parede celular são distintamente diferentes nesses organismos.

A partir da membrana externa, células da *E. coli* e de algumas outras eubactérias projetam estruturas curtas, semelhantes a um cabelo, chamadas de **pilos**, pelas quais as células aderem à superfície de outras células. Cepas de *E. coli* e outras bactérias móveis possuem um ou mais **flagelos**, que podem propelir a bactéria através da sua vizinhança aquosa. Os flagelos bacterianos são bastões helicoidais, finos, rígidos, de 10 a 20nm de espessura e alcançando várias centenas de micrômetros de comprimento. Eles estão ligados a um motor rotatório, uma estrutura protéica que gira no plano da superfície celular, rodando o flagelo.

O citoplasma da *E. coli* contém cerca de 15.000 ribossomos, milhares de cópias de cada um dos vários milhares de enzimas diferentes, numerosos metabólitos e co-fatores e uma variedade de íons inorgânicos. Sob algumas condições, grânulos de polissacarídeos ou gotículas de lipídios se acumulam. O nucleóide contém uma molécula circular única de DNA. Embora a molécula de DNA de uma célula da *E. coli* seja quase 1.000 vezes maior do que a própria célula, ela é empacotada com proteínas e firmemente dobrada no nucleóide, que é menor que $1\mu m$ na sua maior dimensão. Como em todas as bactérias, nenhuma membrana envolve o material genético. Além do DNA no nucleóide, o citoplasma da maioria das bactérias contém segmentos circulares de DNA menores chamados de **plasmídios.** Na natureza, alguns plasmídios conferem resistência a toxinas e antibióticos no ambiente. No laboratório, esses segmentos de DNA não-essenciais são especialmente apropriados à manipulação experimental e extremamente úteis aos geneticistas moleculares.

Há uma divisão de trabalho dentro da célula bacteriana. O envelope celular, que inclue a membrana plasmática, regula o fluxo de materiais para dentro e para fora da célula e protege a célula de agentes ambientais nocivos. A membrana plasmática e o citoplasma contêm uma variedade de enzimas essenciais ao metabolismo energético e à síntese de moléculas precursoras; os ribossomos fabricam proteínas; o nucleóide armazena e transmite a informação genética. A maioria das bactérias leva uma existência que é quase independente de outras células, mas algumas espécies bacterianas tendem a se associar em agrupamentos ou filamentos e algumas (as mixobactérias, por exemplo) demonstram um comportamento social simples.

Evolução das Células Eucarióticas

Fósseis mais antigos do que 1,5 bilhão de anos estão limitados àqueles organismos pequenos e relativamente simples, semelhantes na forma e no tamanho aos procariotos modernos. Iniciando-se há cerca de 1,5 bilhão de anos, os registros fósseis começam a mostrar evidência de organismos mais complexos e maiores, provavelmente as primeiras células eucarióticas (Fig. 2-4). Detalhes da via evolucionária dos procariotos para os eucariotos não podem ser deduzidos apenas a partir dos registros fósseis, entretanto comparações morfológicas e bioquímicas de organismos modernos sugerem uma seqüência razoável de eventos consistentes com a evidência fóssil.

As células eucarióticas evoluíram das procarióticas em várias etapas

Três alterações principais devem ter ocorrido quando os procariotos deram origem aos eucariotos (Fig. 2-6). Primeiro, as células adquiriram mais DNA, surgiram mecanismos que o dobraram e o compactaram em discretos complexos com proteínas específicas e dividiram-no igualmente entre as células filhas durante a divisão celular. Esses complexos DNA-proteína, os

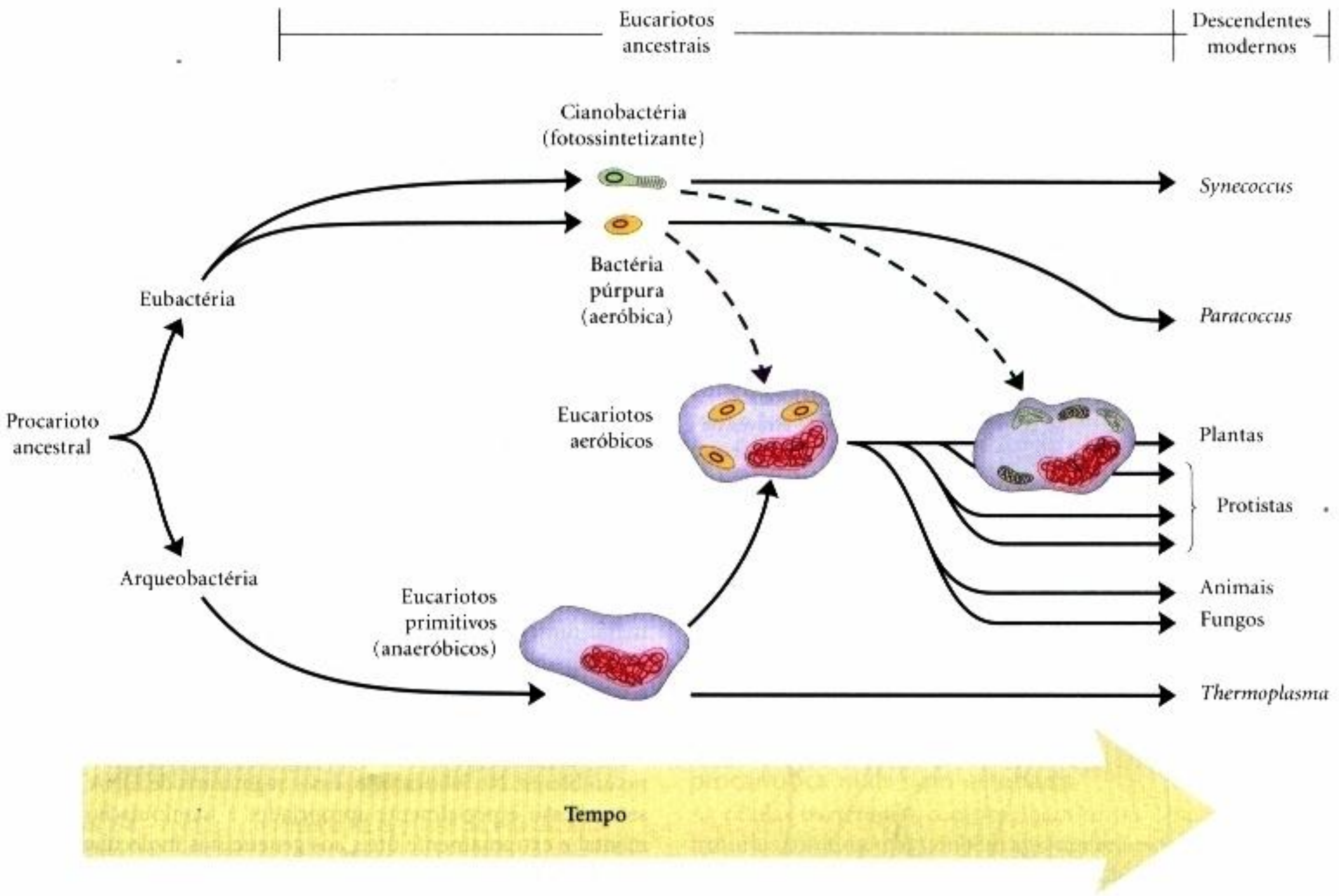


Figura 2-6 – Evolução dos eucariotos. Os organismos modernos podem ter se originado a partir de um ancestral procarioto comum por meio de uma série de associações endossimbióticas. O eucarioto anaeróbico primitivo derivou suas estruturas nucleares (vermelho) a partir de uma arqueobactéria, e suas estrututras móveis (não mostradas), a partir de uma eubactéria anaeróbica com a qual se fundiu. Esse eucarioto primitivo mais tarde adquiriu a bactéria púrpura endossimbiótica (laranja), a qual adquiriu sua capacidade para catabolismo aeróbico e se tornou mais tarde a mitocôndria. Quando a cianobactéria fotossintetizante (verde) se tornou subseqüentemente endossimbionte de alguns eucariotos aeróbicos, essas células se tornaram os precursores fotossintetizantes das modernas algas verdes e plantas.

cromossomos (do grego *chroma*, "cor", e *soma*, "corpo"), tornam-se especialmente compactados no instante da divisão celular, quando podem ser visualizados ao microscópio óptico como fios de **cromatina**.

Segundo, à medida que as células se tornaram maiores, um sistema de membranas intracelulares se desenvolveu, incluindo a membrana dupla que envolve o DNA. Essa membrana separa o processo nuclear da síntese de RNA usando o DNA como molde do processo citoplasmático da síntese das proteínas nos ribossomos. Finalmente, as células eucarióticas primitivas, que eram incapazes de realizar fotossíntese ou metabolismo anaeróbico, misturaram suas vantagens com as das bactérias aeróbicas ou fotossintetizantes para formar **associações endossimbióticas** que se tornaram permanentes. Algumas bactérias aeróbicas evoluíram para as mitocôndrias dos eucariotos modernos e algumas cianobactérias fotossintetizantes tornaram-se os plastídios, tais como os cloroplastos das algas verdes, os prováveis ancestrais das modernas células das plantas. As células procarióticas e eucarióticas são comparadas na Tabela 2-1.

As células eucarióticas primitivas deram origem a diversos protistas

Com o surgimento das células eucarióticas primitivas, o passo seguinte da evolução levou a uma tremenda diversidade de organismos unicelulares eucarióticos (**protistas**). Alguns deles (os com cloroplastos) assemelhavam-se aos protistas fotossintetizantes modernos como a *Euglena* e as *Chlamydomonas*; outros protistas não-fotossintetizantes eram mais parecidos com o *Paramecium* ou o *Dictyostelium*. Os eucariotos unicelulares são abundantes e as células de todos os organismos multicelulares, animais, plantas e fungos são eucarióticas.

Principais Características Estruturais das Células Eucarióticas

As células eucarióticas típicas (Fig. 2-7) são muito maiores do que as células procarióticas, comumente de 5 a 100μm de diâmetro, com volumes celulares de milhares a milhões de vezes maiores do que aqueles das bactérias. A característica diferenciadora dos eucariotos é o núcleo com uma estrutura interna complexa, envolvida por uma membrana dupla. Outra diferença marcante entre eucariotos e procariotos é que os eucariotos contêm várias outras organelas limitadas por membranas. Os itens a seguir descrevem com mais detalhes as estruturas e os papéis dos componentes das células eucarióticas.

A membrana plasmática contém transportadores e receptores

A superfície externa de uma célula está em contato com outras células, com o fluido extracelular e os solutos, assim como com moléculas nutrientes, hormônios, neurotransmissores e antígenos presentes naquele fluido. As membranas plasmáticas de to-

Tabela 2-1 – Comparação de células procarióticas com eucarióticas

Características	Célula procariótica	Célula eucariótica
Tamanho	Geralmente pequeno (1-10μm)	Geralmente grande (5-100μm)
Genoma	DNA com proteínas não-histonas, genoma no nucleóide, não envolvido por membrana	DNA complexado com proteínas histonas e não-histonas em cromossomos; cromossomos no núcleo com envelope membranoso
Divisão celular	Fissão ou brotamento, não há mitose	Mitose incluindo fuso mitótico; centríolos em muitas espécies
Organelas ligadas a membranas	Ausentes	Mitocôndria, cloroplastos (em plantas e algumas algas), retículo endoplasmático, complexos de Golgi, lisossomos (em animais etc.)
Nutrição	Absorção, alguns fotossintetizantes	Absorção, ingestão, fotossíntese em algumas espécies
Metabolismo energético	Não há mitocôndria, enzimas oxidativas ligadas à membrana plasmática; grande variação no padrão metabólico	Enzimas oxidativas empacotadas na mitocôndria; padrão mais unificado de metabolismo oxidativo
Citoesqueleto	Nenhum	Complexo, com microtúbulos, filamentos intermediários, filamentos de actina
Movimento intracelular	Não possui	Citoplasma fluídico, endocitose, fagocitose, mitose, vesícula de transporte

Fonte: Modificado de Hickman CP, Roberts LS & Hickman FM. (1990) *Biology of Animals*, 5th edn, p. 30 Mosby-Yearbook, Inc., St. Louis, MO.

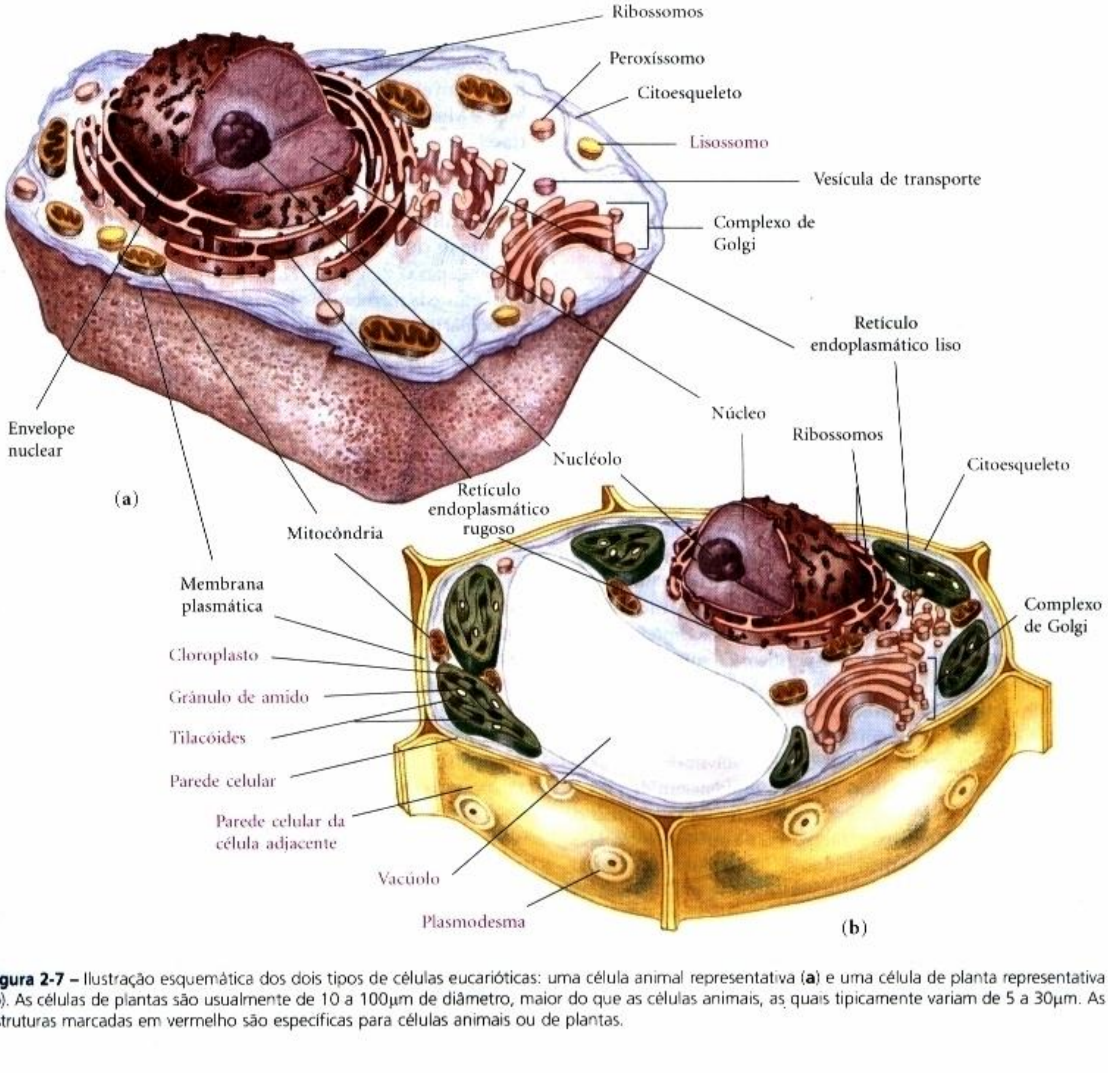

Ribossomos
Peroxíssomo
Citoesqueleto
Lisossomo
Vesícula de transporte
Complexo de Golgi
Retículo endoplasmático liso
Núcleo
Envelope nuclear
Nucléolo
Retículo endoplasmático rugoso
(a)
Mitocôndria
Ribossomos
Citoesqueleto
Membrana plasmática
Complexo de Golgi
Cloroplasto
Grânulo de amido
Tilacóides
Parede celular
Parede celular da célula adjacente
Vacúolo
Plasmodesma
(b)

Figura 2-7 – Ilustração esquemática dos dois tipos de células eucarióticas: uma célula animal representativa (**a**) e uma célula de planta representativa (**b**). As células de plantas são usualmente de 10 a 100μm de diâmetro, maior do que as células animais, as quais tipicamente variam de 5 a 30μm. As estruturas marcadas em vermelho são específicas para células animais ou de plantas.

das as células contêm uma variedade de **transportadores**, proteínas que atravessam a espessura da membrana e transportam nutrientes para dentro e produtos residuais para fora da célula. As células possuem também proteínas de superfície da membrana (**receptores de sinais**) que apresentam sítios de ligação altamente específicos para moléculas sinalizadoras extracelulares (ligantes dos receptores). Quando um **ligante** externo se une ao seu receptor específico, a proteína receptora traduz o sinal transportado por esse ligante em uma mensagem intracelular (Fig. 2-8). Por exemplo, alguns receptores de superfície estão associados com **canais iônicos** que se abrem quando o receptor está ocupado, permitindo a entrada de íons específicos; outros ativam ou inibem enzimas celulares na superfície da membrana interna. Qualquer que seja o modo de **transdução de sinal**, os receptores da superfície atuam caracteristicamente como amplificadores de sinal — uma única molécula ligante unida a um único receptor pode provocar o fluxo de milhares de íons através de um canal aberto, ou a síntese de milhares de moléculas de um mensageiro intracelular por uma enzima ativada.

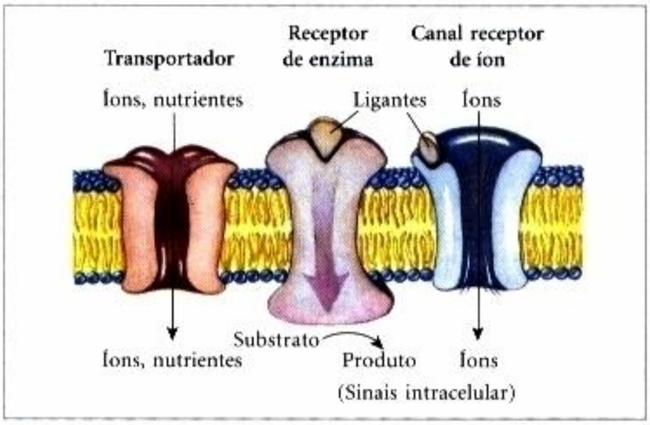


Figura 2-8 – Proteínas na membrana plasmática funcionam como transportadores, receptores de sinais e canais iônicos. Transportadores carregam substâncias para o interior e o exterior da célula; alguns transportadores usam energia para bombear íons e compostos contra um gradiente de concentração. Sinais extracelulares são amplificados pelos receptores: a ligação de uma única molécula ligante no receptor de superfície propicia a formação de muitas moléculas de um mensageiro intracelular, ou o fluxo de muitos íons através de um canal aberto.

Alguns receptores de superfície reconhecem ligantes de baixo peso molecular e outros reconhecem macromoléculas. Por exemplo, a ligação da acetilcolina (M_r 146) ao seu receptor desencadeia uma cascata de eventos celulares que estão por trás da transmissão de sinais para a contração muscular. Proteínas sangüíneas ($M_r > 20.000$) que transportam lipídios (lipoproteínas) são reconhecidas por receptores específicos da superfície celular e então transportadas para dentro das células. Antígenos (proteínas, vírus ou bactérias reconhecidos pelo sistema imune como estranhos) ligam-se a receptores específicos e desencadeiam a produção de anticorpos. Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, células vizinhas influenciam as vias de desenvolvimento da outra, como se fossem moléculas-sinal de um tipo celular reagindo com receptores de outras células. Dessa forma, a superfície da membrana de uma célula é um mosaico complexo de diferentes espécies de "antenas moleculares" altamente específicas, por meio das quais as células recebem, amplificam e reagem a sinais externos.

A maioria das células das plantas superiores possui uma **parede celular** do lado de fora da membrana plasmática (veja Fig. 2-7b) que funciona como uma cobertura protetora rígida. A parede celular composta de celulose e outros polímeros de carboidratos é espessa, mas porosa. Ela permite que a água e as moléculas pequenas passem facilmente, entretanto o inchaço da célula devido ao acúmulo de água é contido pela rigidez da parede.

A endocitose e a exocitose realizam fluxo através da membrana plasmática

Endocitose é um mecanismo para o transporte de componentes do meio circundante para o interior do citoplasma. Nesse processo (Fig. 2-9), uma região da membrana plasmática se invagina, englobando um pequeno volume do fluido extracelular dentro de um broto que se estreita e entra na célula pela fissão da membrana. A pequena vesícula resultante (**endossomo**) pode-se mover dentro do interior da célula, entregando o seu conteúdo para uma outra organela limitada por uma membrana única (um lisossomo, por exemplo, veja pág. 26), pela fusão das duas membranas. O endossomo, dessa forma, funciona como uma extensão intracelular da membrana plasmática, permitindo efetivamente o contato íntimo entre componentes do meio extracelular e regiões do citoplasma, que não poderiam ser atingidas pela difusão simples. A **fagocitose** é um caso especial de endocitose, em que o material transportado para dentro da célula (dentro de um fagossomo) é uma partícula como um fragmento celular ou mesmo uma outra célula pequena. O inverso da endocitose é a **exocitose** (Fig. 2-9), na qual uma vesícula no citoplasma se move para a superfície interna da membrana plasmática e se funde com ela, liberando o conteúdo vesicular para fora da membrana. Muitas proteínas destinadas à secreção para o espaço extracelular são empacotadas para o interior de vesículas, chamadas de grânulos de secreção, e são liberadas pela exocitose.

O retículo endoplasmático organiza a síntese de proteínas e lipídios

As pequenas vesículas de transporte que se movem para dentro e para fora da membrana plasmática na endocitose e na exocitose são partes de um sistema dinâmico de membranas intracelulares que inclui o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, o envelope nuclear e uma variedade de vesículas pequenas como os lisossomos e os peroxissomos (Fig. 2-9). Embora geralmente apresentadas como elementos estáticos e distintos, essas estruturas estão de fato em fluxo constante, com vesículas continuamente brotando de uma estrutura, movendo-se através da célula e fundindo-se com estruturas membranosas em outros lugares.

O **retículo endoplasmático** (RE) é uma rede tridimensional de espaços envoltos por membrana altamente enrolada, que se estende por todo o citoplasma e envolve um compartimento subcelular (a luz do retículo endoplasmático) separado do citoplasma. Muitas das ramificações planas (cisternas) desse compartimento são contínuas entre si e com o envelope nuclear. Nas células especializadas na secreção de proteínas para o espaço extracelular, como as células pancreáticas que secretam o hormônio insulina, o retículo endoplasmático é particularmente proeminente. Os ribossomos que sintetizam as proteínas destinadas à exportação se ligam à superfície externa (citoplasmática) do retículo endoplasmático, e as proteínas secretadas passam através da membrana para a luz, assim que são sintetizadas. Enzimas digestivas seqüestradas dentro dos lisossomos ou proteínas destinadas para a inserção nas membranas plasmáticas ou nucleares são também sintetizadas nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático. Diferentemente, proteínas que devam permanecer e funcionar dentro do citosol são sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos não associados com o retículo endoplasmático.

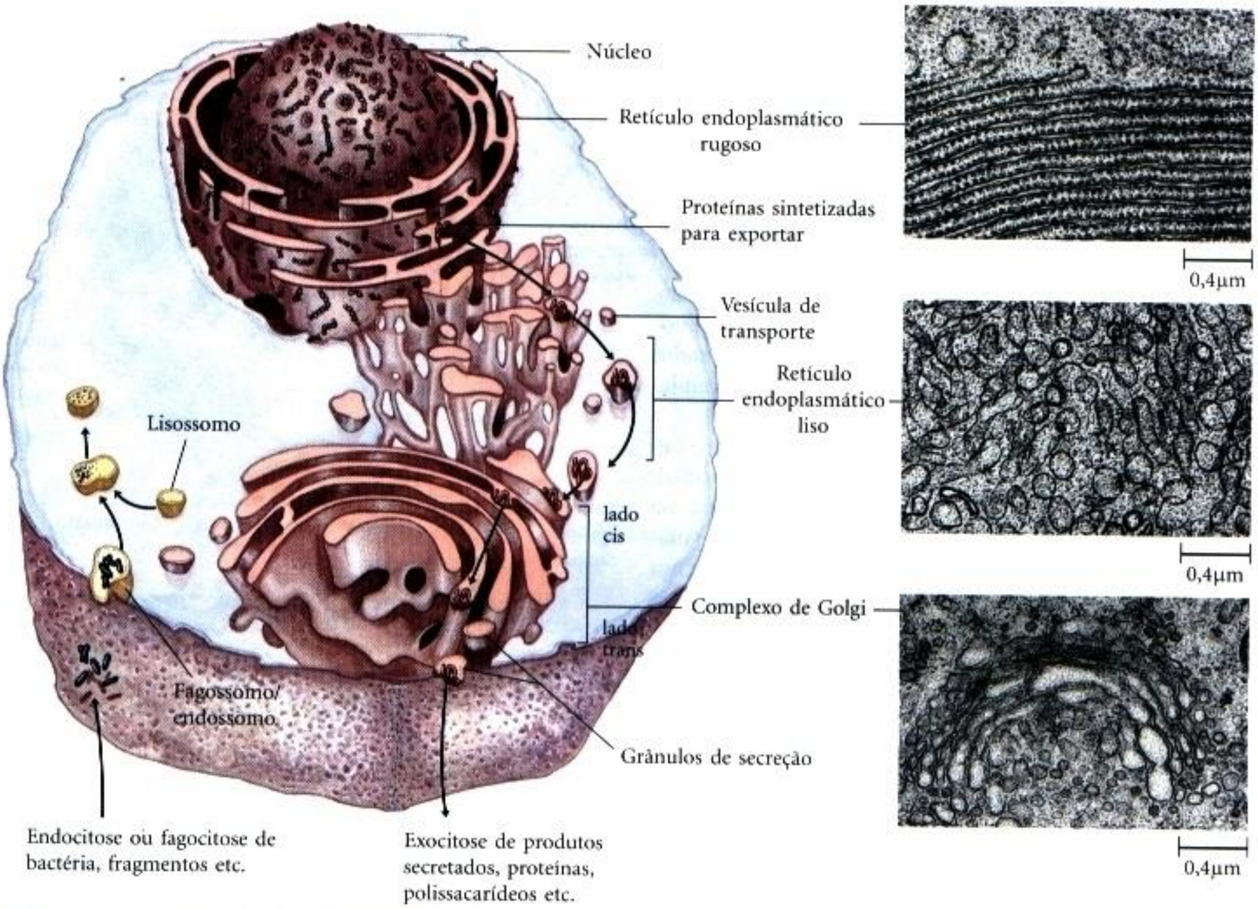

Núcleo
Retículo endoplasmático rugoso
Proteínas sintetizadas para exportar
Vesícula de transporte
Retículo endoplasmático liso
Lisossomo
lado cis
Complexo de Golgi
lado trans
Fagossomo/ endossomo
Grânulos de secreção
Endocitose ou fagocitose de bactéria, fragmentos etc.
Exocitose de produtos secretados, proteínas, polissacarídeos etc.
0,4μm
0,4μm
0,4μm

Figura 2-9 – O sistema das endomembranas. Esse sistema inclui o envelope nuclear, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e vários tipos de vesículas pequenas. Esse sistema envolve um compartimento (luz) distinto do citosol. Os conteúdos da luz movem-se de uma região do sistema de endomembranas para outra, como pequenas vesículas de transporte que brotam de um componente e se fundem a outro. Eletromicrografias de grande aumento de uma célula seccionada mostram o retículo endoplasmático rugoso, salpicado com ribossomos, o retículo endoplasmático liso e o complexo de Golgi. (O tamanho do complexo de Golgi está exagerado no diagrama para maior clareza.) O sistema das endomembranas é dinâmico; proteínas recém-sintetizadas movem-se para a luz do retículo endoplasmático rugoso e depois para o retículo endoplasmático liso e, então, para o complexo de Golgi, por meio de vesículas de transporte. A porção cis do complexo de Golgi faceia o núcleo; a porção trans é a que está mais próxima da membrana plasmática. No complexo de Golgi, "endereços" moleculares são adicionados às proteínas específicas para direcioná-las para a superfície celular, para os lisossomos ou para as vesículas secretoras. Os conteúdos das vesículas secretoras são liberados pela célula por exocitose. A endocitose e a fagocitose trazem materiais extracelulares para dentro da célula. A fusão dos endossomos (ou fagossomos) com os lisossomos, que são repletos de enzimas digestivas, leva à degradação dos materiais extracelulares.

A ligação de milhares de ribossomos (geralmente nas regiões das grandes cisternas) fornece ao **retículo endoplasmático rugoso** sua aparência granular (Fig. 2-9) e também o seu nome. Em outras regiões da célula, o retículo endoplasmático está livre de ribossomos. Esse **retículo endoplasmático liso**, fisicamente contínuo com o retículo endoplasmático rugoso, é o sítio da biossíntese dos lipídios e de uma variedade de outros processos importantes, incluindo o metabolismo de certas drogas e compostos tóxicos. O retículo endoplasmático liso é geralmente tubular, diferentemente das longas cisternas planas típicas do retículo endoplasmático rugoso. Em alguns tecidos (músculo esquelético, por exemplo), o retículo endoplasmático é especializado no armazenamento e na rápida liberação de íons cálcio. O Ca^{2+} liberado é o desencadeante de muitos eventos celulares, incluindo a contração muscular.

O complexo de Golgi processa e distribui as proteínas

Quase todas as células eucarióticas possuem **complexos de Golgi**, sistema de cavidades membranosas ou cisternas, arranjadas como feixes planos (Fig. 2-9). Nomeado após a sua descoberta por Camillo Golgi, o complexo de Golgi é estrutural e funcionalmente assimétrico. O lado cis faceia o retículo endoplasmático rugoso (e o núcleo) e o lado trans faceia a membrana plasmática; entre estes estão os elementos mediais. As proteínas, durante sua síntese nos ribossomos, ligam-se ao retículo endoplasmático rugoso e são inseridas no interior (luz) das cisternas do retículo endoplasmático. Pequenas vesículas de membrana contendo as proteínas recentemente sintetizadas brotam a partir do RE e movem-se para o complexo de Golgi, fundindo-se com o lado cis. Quando as proteínas passam através do complexo de Golgi para o lado trans, enzimas no complexo modificam as moléculas protéicas pela adição de sulfato, carboidrato ou porções lipídicas para as cadeias laterais de certos aminoácidos. Uma das funções dessa modificação de uma proteína recém-sintetizada é "endereçá-la" à sua destinação própria, assim que ela deixa o complexo de Golgi em uma vesícula de transporte que brota do lado trans. Certas proteínas são envoltas em grânulos secretórios, eventualmente para serem liberadas da célula por exocitose. Outras são destinadas a organelas intracelulares como os lisossomos, ou para a incorporação na membrana plasmática durante o crescimento celular.

Os lisossomos são os locais das reações degradativas

Lisossomos, encontrados somente em células animais, são vesículas esféricas envoltas por uma simples membrana bilaminada (Fig. 2-9). Eles têm usualmente cerca de 1µm de diâmetro. Os lisossomos contêm enzimas capazes de digerir proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e lipídios. Eles funcionam como centros celulares de reciclagem fragmentando moléculas complexas trazidas para a célula por endocitose. Esses materiais entram seletivamente nos lisossomos pela fusão da membrana lisossomal com endossomos, fagossomos ou organelas defeituosas e são, então, degradados aos seus componentes mais simples (aminoácidos, monossacarídeos, ácidos graxos etc.) que são liberados no citosol para serem reciclados em novos componentes celulares ou catabolizados.

As enzimas degradativas dentro dos lisossomos seriam perigosas se não fossem confinadas pela membrana lisossomal: seriam livres para agir em todos os componentes celulares. Uma segunda linha de defesa contra a destruição indesejável de macromoléculas citosólicas pelas enzimas lisossomais é a diferença de pH entre o lisossomo e o citosol, mantida pela ação de uma bomba de prótons impulsionada por ATP na membrana lisossomal. O compartimento lisossomal é mais ácido ($pH \leq 5$) do que o citoplasma ($pH \approx 7$), e as enzimas lisossomais são praticamente inativas no pH elevado do citosol.

Os vacúolos das células de plantas desempenham várias funções importantes

As células das plantas não possuem lisossomos, embora seus **vacúolos** desempenhem reações degradativas semelhantes, bem como outras funções não encontradas nas células animais. As células de plantas em crescimento contêm vários vacúolos pequenos, vesículas envoltas por uma bicamada de membrana única, que se fundem e se tornam um grande vacúolo central (Fig. 2-10; veja também Fig. 2-7b). O vacúolo pode representar cerca de 90% do volume total da célula madura, pressionando o citoplasma a tornar-se uma fina camada entre o vacúolo e a membrana plasmática. A membrana envolvendo o vacúolo, chamada de **tonoplasto**, regula a entrada de íons, metabólitos e estruturas celulares destinadas à degradação, e o líquido dentro do vacúolo contém enzimas digestivas que degradam e reciclam os componentes macromoleculares. Desde que no lisossomo, o pH dentro do vacúolo é geralmente inferior ao pH do vizinho citosol. Em algumas células de plantas, o vacúolo contém altas concentrações de pigmentos (antocianinas) responsáveis pela coloração púrpura e vermelha das folhas e frutos. Em adição ao seu papel de estoque e degradação de componentes celulares, o vacúolo também fornece suporte físico para a célula da planta. Devido à concentração de solutos (sais, íons, produtos degradados) ser maior no vacúolo do que no citosol, a água passa osmoticamente para o interior do vacúolo, no equilíbrio, uma **pressão de turgor** sobre o citoplasma e a parede celular estabiliza o tecido da planta (Fig. 2-10).

Os peroxissomos destroem os peróxidos de hidrogênio e os glioxissomos convertem gorduras em carboidratos

Algumas das reações oxidativas na degradação dos aminoácidos e gorduras produzem radicais livres e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécies químicas muito reativas que podem lesar a maquinaria celular. Para proteger a célula desses subprodutos destrutivos, tais reações são segregadas dentro de pequenas vesículas, envoltas por membrana, chamadas de **peroxissomos**.

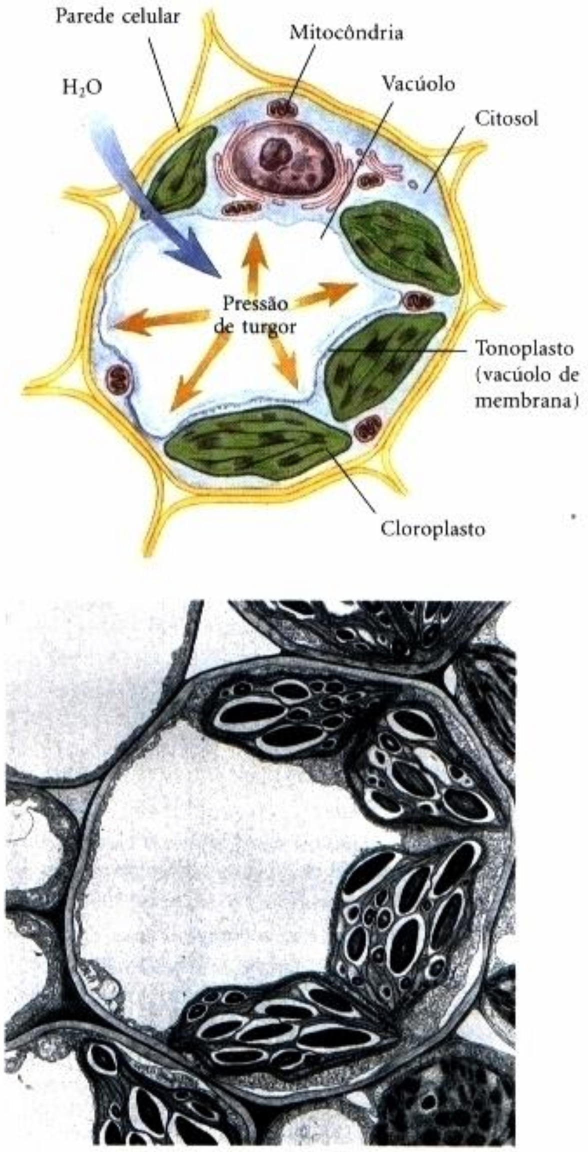


Figura 2-10 – O vacúolo de uma célula de planta contém altas concentrações de Ca^{2+} e uma variedade de compostos de armazenamento e produtos residuais. A água entra no vacúolo aumentando o volume vacuolar e pressionando o citoplasma contra a membrana plasmática, criando a pressão de turgor. A rigidez da parede celular previne a expansão e a ruptura da membrana plasmática.

O peróxido de hidrogênio é degradado pela catalase, uma enzima presente em altas concentrações nos peroxissomos, que catalisa a reação:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Glioxissomos são peroxissomos especializados encontrados em certas células de plantas. Eles contêm altas concentrações de enzimas do **ciclo do glioxilato**, uma via metabólica exclusiva das plantas que permite a conversão de gorduras armazenadas em carboidratos durante a germinação das sementes. Os lisossomos, os peroxissomos e os glioxissomos são algumas vezes relatados coletivamente como **microcorpos**.

O núcleo contém o genoma

O núcleo eucariótico é muito complexo tanto na sua estrutura quanto na sua atividade biológica, quando comparado com o nucleóide relativamente simples dos procariotos. O núcleo contém quase todo o DNA da célula, podendo ser milhares de vezes

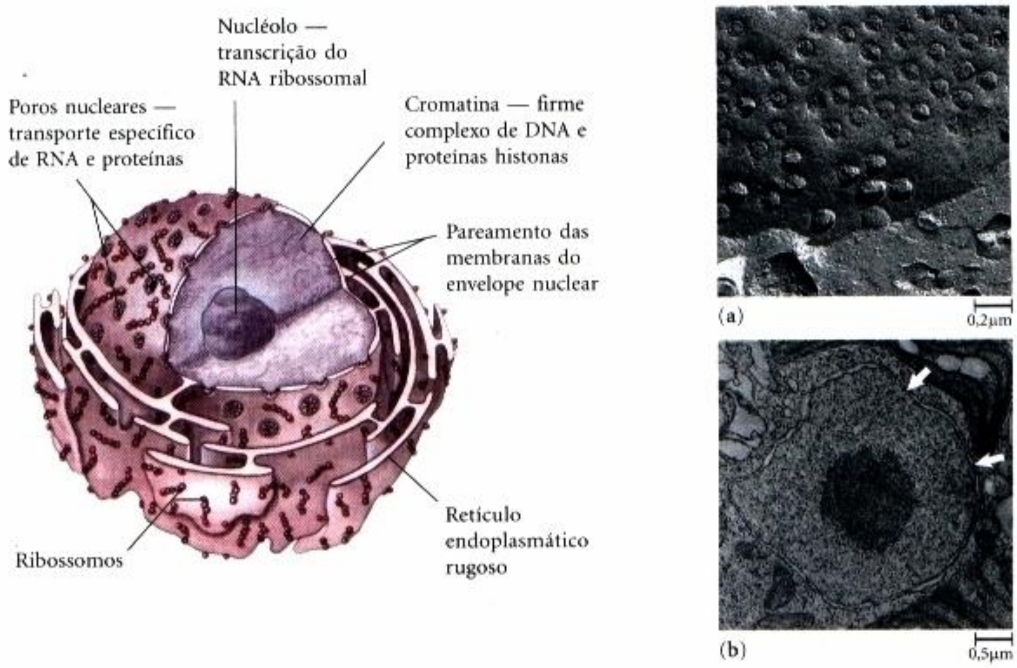

Nucléolo — transcrição do RNA ribossomal
Poros nucleares — transporte específico de RNA e proteínas
Cromatina — firme complexo de DNA e proteínas histonas
Pareamento das membranas do envelope nuclear
Retículo endoplasmático rugoso
Ribossomos
(a)
0,2μm
(b)
0,5μm

Figura 2-11 – O núcleo e o envelope nuclear. (**a**) Eletromicrografia de varredura da superfície do envelope nuclear, mostrando numerosos poros nucleares. (**b**) Eletromicrografia do núcleo da alga *Chlamydomonas*. O corpo escuro no centro do núcleo é o nucléolo e o material granular que preenche o restante do núcleo é a cromatina. Dois poros nucleares perfurando o par de membranas do envelope nuclear são mostrados por setas.

maior que o presente numa célula bacteriana; uma pequena quantidade de DNA está também presente nas mitocôndrias e cloroplastos. O núcleo é envolto por um **envelope nuclear**, composto de duas bicamadas de membranas separadas por um espaço estreito e contínuo com o retículo endoplasmático rugoso (Fig. 2-11; veja também Fig. 2-9). A intervalos, as membranas nucleares interna e externa são estreitadas em volta de aberturas (**poros nucleares**), que possuem um diâmetro de cerca de 90nm. Associadas aos poros estão estruturas protéicas chamadas de complexos do poro nuclear, transportadores específicos que permitem apenas certas macromoléculas passarem entre o citoplasma e a fase aquosa do núcleo (o **nucleoplasma**). O tráfico para o núcleo através do complexo do poro nuclear inclui enzimas e outras proteínas sintetizadas no citoplasma e requeridas no nucleoplasma para a replicação do DNA e o reparo, transcrição e processamento do RNA. Passando através dos poros nucleares estão os precursores de RNA mensageiros, associados a proteínas, os quais serão traduzidos nos ribossomos, no citoplasma.

O núcleo na interfase celular (não dividindo) é preenchido com um material difuso chamado de **cromatina**, assim chamada devido aos microscopistas pioneiros encontrarem que ela brilhava com certos corantes. A cromatina consiste de DNA e proteínas mantidas ligadas firmemente e é a substância dos cromossomos os quais não condensam e se tornam individualmente visíveis até que a célula se torne apta para a divisão. O **nucléolo** é uma região específica do núcleo onde o DNA contém muitas cópias dos genes codificando para RNA ribossomal. Para produzir grande número de ribossomos necessários para a célula, esses genes estão continuamente transcrevendo para RNA. O nucléolo apresenta-se denso à microscopia eletrônica (Fig. 2-11b) devido ao seu alto conteúdo de RNA. O RNA ribossomal produzido no nucléolo entra no citoplasma através dos poros nucleares.

A divisão nuclear (**mitose**) ocorre antes da divisão celular (**citocinese**). A dupla hélice do DNA da cromatina é replicada, então, na primeira fase da mitose, as fibras de cromatina condensam em corpúsculos discretos, os **cromossomos**, cada um consistindo de duas **cromátides** idênticas (Fig. 2-12). As duas cromátides irmãs separam-se, movimentando-se para cada pólo da célula onde se tornam parte do núcleo recentemente formado na célula filha.

Células de cada espécie possuem um número característico de cromossomos com tamanhos e formas específicas. Por exemplo, o protista *Tetrahymena pyriformis* possui 5 pares; o repolho, 9; o homem, 23; e a samambaia *Ophioglossum reticulatum*, cerca de 630! As células que compõem a maior parte de um organismo multicelular, as células somáticas, possuem duas cópias de cada cromossomo, tais células são chamadas de **diplóides** (**2*n***). Gametas (ovo e espermatozóide, por exemplo) produzidos por meiose (Capítulo 25) possuem apenas uma cópia de cada par de cromossomos e são chamados de **haplóides** (***n***). Durante a reprodução sexual, dois gametas haplóides se combinam para regenerar uma célula diplóide, na qual cada par de cromossomo consiste de um cromossomo paterno e um materno.

O DNA da cromatina e dos cromossomos está firmemente ligado a uma família de proteínas carregadas positivamente, as **histonas**, que se associam fortemente com o DNA por interações iônicas com os seus muitos grupos fosfato carregados negativamente. Cerca de metade da massa da cromatina é DNA, e a outra metade, histonas. Quando o DNA se replica antes da divisão celular, grandes quantidades de histonas são também sintetizadas para manter uma proporção de massa 1:1. As histonas e o DNA associam-se em complexos chamados de **nucleossomos**, nos quais a fita de DNA se enrola em volta de um núcleo de moléculas de histonas (Fig. 2-12). O DNA de um único cromossomo humano forma cerca de um milhão de nucleossomos; os nucleossomos associam-se para formar complexos supramoleculares muito regulares e compactos. As fibras de cromatina resultantes, com cerca de 30nm de diâmetro, condensam-se formando uma série de regiões de alças, que se agregam a regiões de alças adjacentes, formando os cromossomos visíveis durante a divisão celular. Esse DNA fortemente empacotado nos nucleossomos alcança uma condensação notável das moléculas de DNA. O DNA nos cromossomos de uma única célula humana diplóide teria um comprimento total de cerca de 2m se fosse totalmente esticado, entretanto o comprimento combinado de todos os 46 cromossomos é apenas de aproximadamente 200μm.

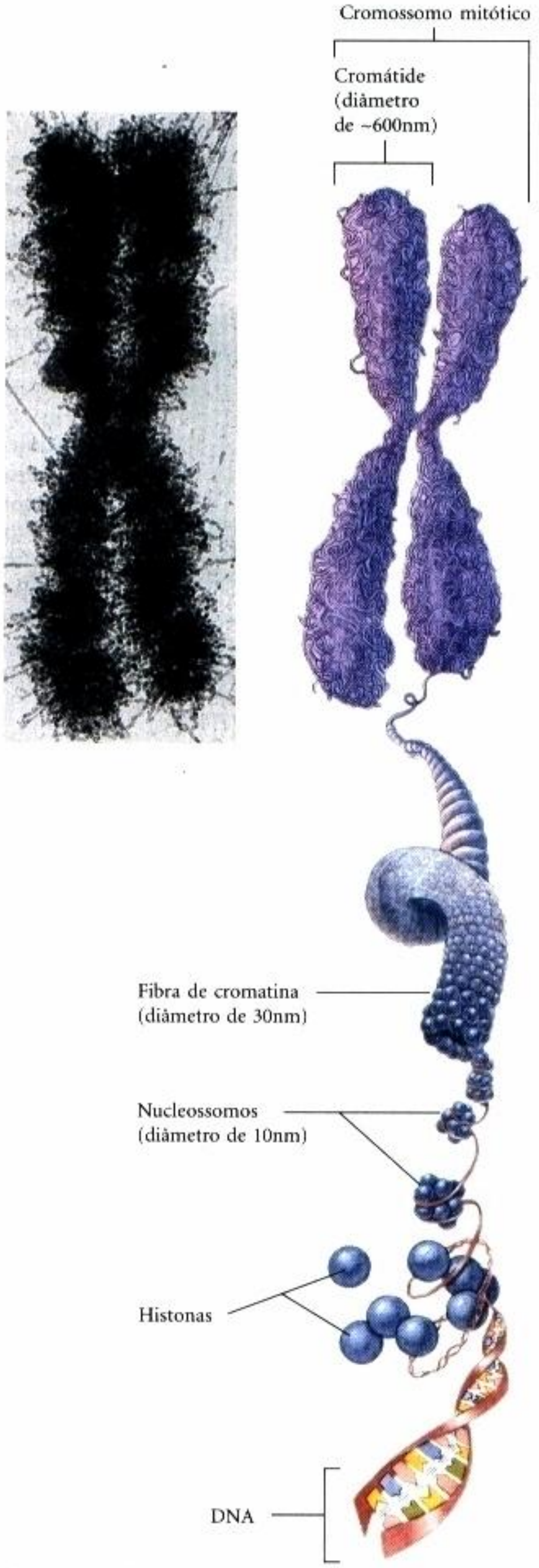

Cromossomo mitótico
Cromátide (diâmetro de ~600nm)
Fibra de cromatina (diâmetro de 30nm)
Nucleossomos (diâmetro de 10nm)
Histonas
DNA

Figura 2-12 – Os cromossomos estão visíveis microscopicamente durante a mitose. Aqui está mostrado, em microscopia eletrônica, um dos 46 cromossomos humanos numa célula diplóide (somática). Cada cromossomo mitótico é composto de duas cromátides, cada uma consistindo de fibras de cromatina fortemente dobradas. Cada fibra de cromatina está, por sua vez, formada pelo empacotamento de uma molécula de DNA embrulhada por proteínas histônicas, formando uma série de nucleossomos. (Adaptado de Becker WM & Deamer DW. (1991) *The World of the Cell*, 2nd edn, Fig. 13-20, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.)

As mitocôndrias são as estações de força das células eucarióticas aeróbicas

Mitocôndrias são muito evidentes no citoplasma da maioria das células eucarióticas quando vistas por microscopia eletrônica (Fig. 2-13). Essas organelas envoltas por membrana variam de tamanho, embora tipicamente possuam um diâmetro de cerca de 1μm, semelhante ao das células bacterianas. As mitocôndrias também variam amplamente na forma, número e localização, dependendo do tipo celular ou da função do tecido. A maioria das células das plantas e dos animais contém de várias centenas a milhares de mitocôndrias. Geralmente, as células de tecidos metabolicamente mais ativos devotam uma maior proporção do seu volume à mitocôndria.

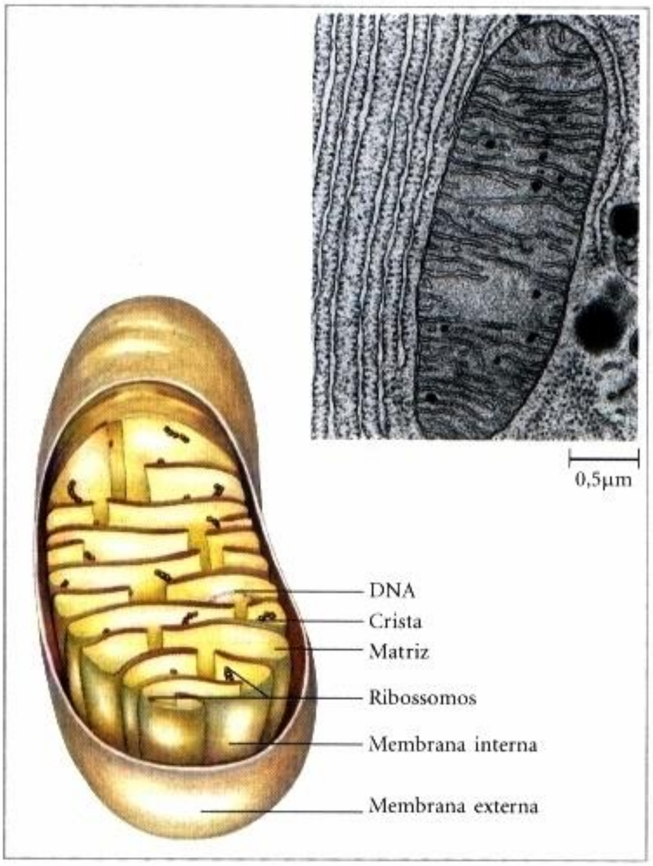


Figura 2-13 – Estrutura de uma mitocôndria. Esta eletromicrografia mostra a extensiva invaginação da membrana interna; as invaginações são chamadas de cristas. (Observe o extenso retículo endoplasmático rugoso que circunda a mitocôndria.)

Cada mitocôndria possui duas membranas. A membrana externa é lisa e envolve completamente a organela. A membrana interna possui invaginações chamadas de **cristas**, que lhe dão uma grande área de superfície. Envolvida pela membrana interna está a **matriz**, uma solução aquosa muito concentrada de muitas enzimas e intermediários químicos envolvidos no metabolismo produtor de energia.

As enzimas mitocondriais catalisam a oxidação dos nutrientes orgânicos pelo oxigênio molecular (O_2), algumas dessas enzimas estão na matriz e outras estão incrustadas na membrana interna. A energia química liberada nas oxidações mitocondriais é usada para gerar ATP, a principal molécula transportadora de energia das células. Nas células aeróbicas, as mitocôndrias são as principais produtoras do ATP, que se difunde a todas as partes da célula e fornece energia para o trabalho celular.

Diferentemente de outras estruturas membranosas como os lisossomos, os complexos de Golgi e o envelope nuclear, as mitocôndrias são produzidas apenas pela divisão de mitocôndrias preexistentes; cada mitocôndria contém seu próprio DNA, RNA e ribossomos. O DNA mitocondrial codifica certas proteínas específicas da membrana interna mitocondrial. Esta e outra evidência apóiam a teoria (mencionada a seguir) de que as mitocôndrias são descendentes das bactérias aeróbicas que viveram endossimbioticamente com as primeiras células eucarióticas.

Os cloroplastos convertem a energia solar em energia química

O citoplasma das plantas contém **plastídios**, organelas especializadas envolvidas por envelopes constituídos de duas membranas. O mais evidente nos plastídios, e caracteristicamente presente nas células fotossintetizantes de plantas e algas, são os **cloroplastos** (Fig. 2-14). Da mesma forma que as mitocôndrias, os cloroplastos podem ser considerados usinas, com a importante diferença de que os cloroplastos usam a energia solar, enquanto as mitocôndrias usam a energia química dos compostos oxidáveis. Moléculas pigmentadas nos cloroplastos absorvem a energia da luz e usam-na para fazer ATP e, no fim, para reduzir o dióxido de carbono para formar carboidratos como o amido e a sacarose. A fotossíntese nos eucariotos e nas cianobactérias produzem O_2 como um subproduto das reações captadoras da luz. As células das plantas fotossintetizantes contêm tanto cloroplastos quanto mitocôndrias. Os cloroplastos produzem ATP somente na presença de luz; a mitocôndria funciona independentemente da luz, oxidando os carboidratos fotossintetizados durante o período de luz solar.

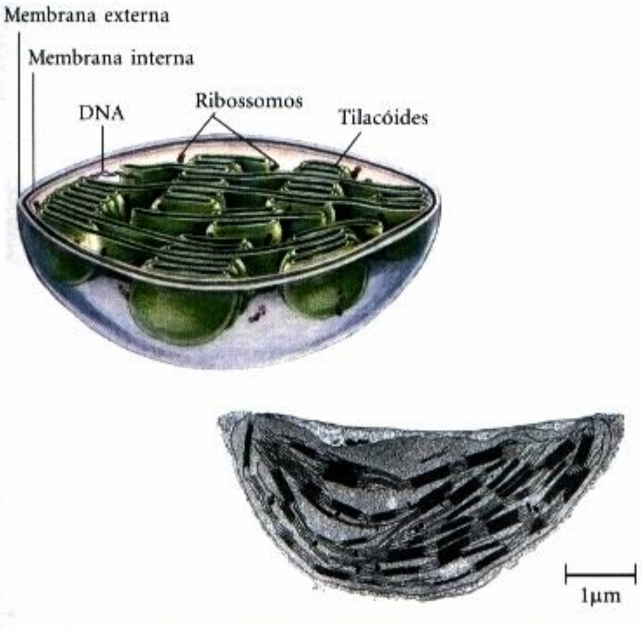


Figura 2-14 – Estrutura de um cloroplasto. Os tilacóides são sacos membranosos achatados que contêm clorofila, o pigmento que capta a luz.

Os cloroplastos são geralmente maiores (diâmetro de 5µm) do que as mitocôndrias e ocorrem em muitas formas diferentes. Pelo fato de os cloroplastos conterem uma alta concentração do **pigmento clorofila**, as células fotossintetizadoras são usualmente verdes, mas a sua cor depende das quantidades relativas de outros pigmentos presentes. Clorofila e outras moléculas pigmentadas, juntas, podem absorver a energia luminosa de grande parte do espectro visível, estão localizadas nas membranas internas dos cloroplastos; estas formam conjunto de cisternas fechadas conhecidas como **tilacóides** (Fig. 2-14). Como as mitocôndrias, os cloroplastos contêm DNA, RNA e ribossomos.

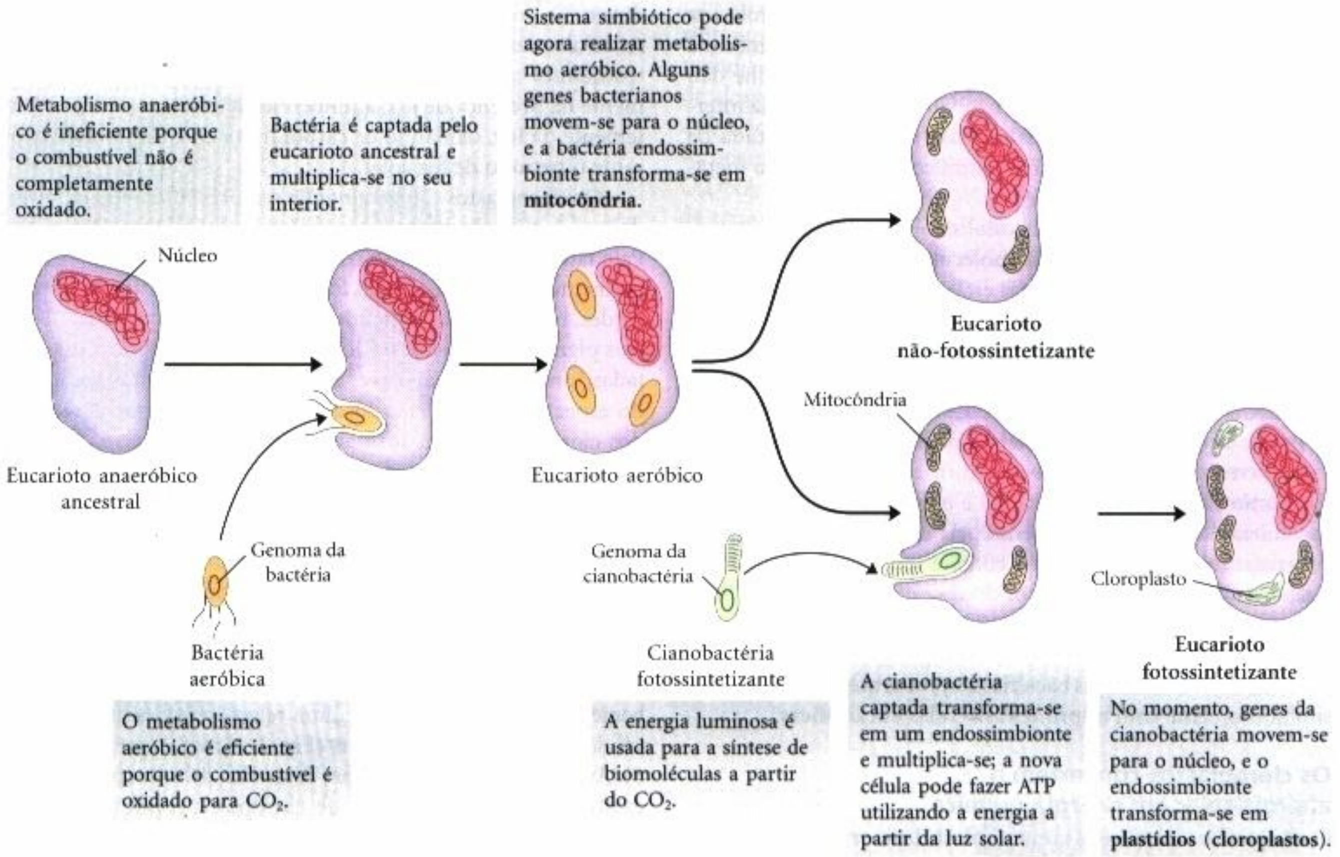
As mitocôndrias e os cloroplastos provavelmente se desenvolveram de bactérias endossimbióticas

Várias linhas independentes de evidência sugerem que as mitocôndrias e os cloroplastos dos eucariotos modernos foram derivados durante a evolução das bactérias aeróbicas e das cianobactérias que se associaram numa relação endossimbiótica nas células eucarióticas primitivas (Fig. 2-15; veja também Fig. 2-6). As mitocôndrias são sempre derivadas de mitocôndrias preexistentes e os cloroplastos de cloroplastos, por fissão simples, da mesma forma que as bactérias se multiplicam por fissão. As seqüências no DNA mitocondrial são notavelmente semelhantes às seqüências encontradas em certas bactérias aeróbicas, e o DNA do cloroplasto mostra seqüências fortemente semelhantes às do DNA de certas cianobactérias. Os ribossomos encontrados na mitocôndria e nos cloroplastos são mais semelhantes no tamanho, na estrutura global e nas seqüências de RNA aos ribossomos das bactérias do que aos encontrados no citoplasma da célula eucariótica. As enzimas que catalisam a síntese de proteínas nessas organelas também se assemelham àquelas das bactérias mais próximas.

Apesar de seu suplemento de DNA e da maquinaria sintetizadora de proteínas, a mitocôndria e os cloroplastos são semi-autônomos. Se essas organelas são de fato descendentes endossimbiontes de bactérias primitivas, alguns dos genes presentes na primitiva bactéria de vida livre devem ter sido transferidos para o DNA nuclear do eucarioto hospedeiro durante o curso da evolução. Nem as mitocôndrias nem os cloroplastos contêm todos os genes necessários para especificar todas as suas proteínas. A maioria das proteínas da mitocôndria e do cloroplasto é codificada nos genes nucleares, traduzida nos ribossomos citoplasmáticos e, subseqüentemente, importada para as organelas.

O citoesqueleto estabiliza a forma celular, organiza o citoplasma e produz movimento

Vários tipos de filamentos de proteínas visíveis ao microscópio eletrônico cruzam a célula eucariótica, formando uma rede tridimensional interligada em todo o citoplasma, o **citoesqueleto**, que se estende por todo o citoplasma. Há três tipos gerais de filamentos citoplasmáticos: filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (Fig. 2-16). Eles diferem em largura (de 6 a 22nm), composição e função específica, mas todos aparentemente fornecem estrutura e organização ao citoplasma e à forma da célula. Filamentos de actina e microtúbulos também ajudam a produzir a movimentação de organelas ou de toda a célula.



Metabolismo anaeróbico é ineficiente porque o combustível não é completamente oxidado.

Bactéria é captada pelo eucarioto ancestral e multiplica-se no seu interior.

Sistema simbiótico pode agora realizar metabolismo aeróbico. Alguns genes bacterianos movem-se para o núcleo, e a bactéria endossimbionte transforma-se em **mitocôndria.**

O metabolismo aeróbico é eficiente porque o combustível é oxidado para CO_2.

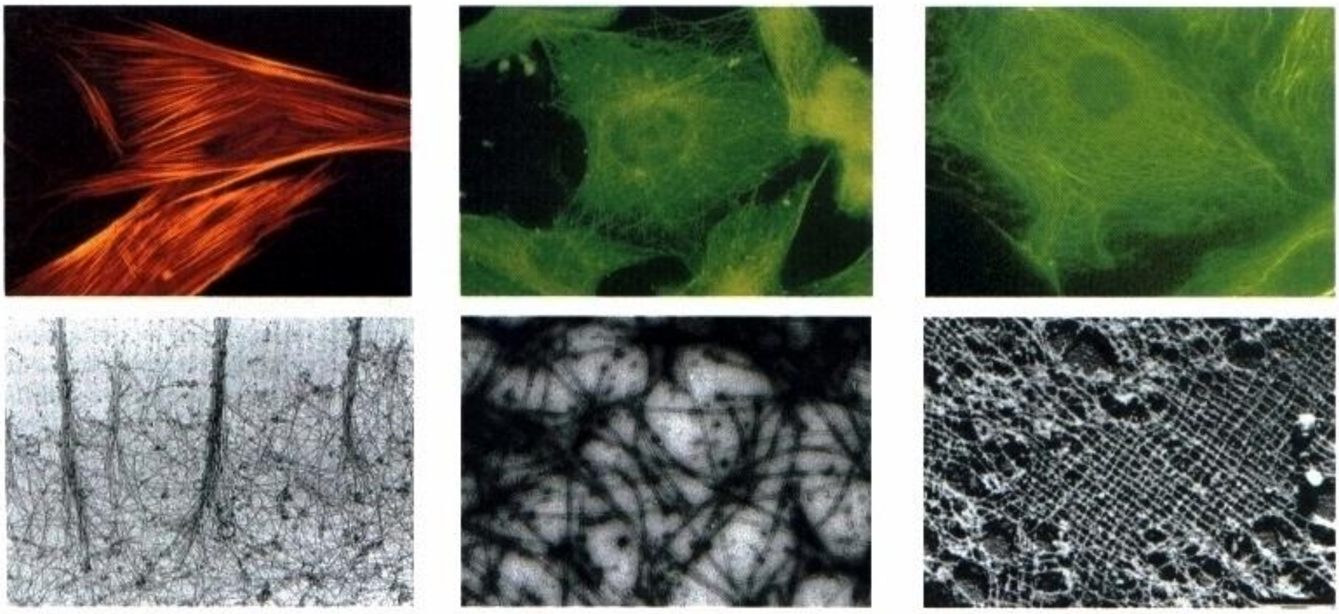
A energia luminosa é usada para a síntese de biomoléculas a partir do CO_2.

A cianobactéria captada transforma-se em um endossimbionte e multiplica-se; a nova célula pode fazer ATP utilizando a energia a partir da luz solar.

No momento, genes da cianobactéria movem-se para o núcleo, e o endossimbionte transforma-se em **plastídios (cloroplastos).**

Núcleo
Eucarioto anaeróbico ancestral
Genoma da bactéria
Bactéria aeróbica
Eucarioto aeróbico
Eucarioto não-fotossintetizante
Mitocôndria
Genoma da cianobactéria
Cianobactéria fotossintetizante
Cloroplasto
Eucarioto fotossintetizante

Figura 2-15 – Uma teoria plausível para a origem evolucionária das mitocôndrias e dos cloroplastos. Ela é baseada em muitas semelhanças bioquímicas e genéticas notáveis entre certas bactérias aeróbicas e as mitocôndrias e entre certas cianobactérias e os cloroplastos. Durante a evolução das células eucarióticas, a bactéria tornou-se simbiótica dentro da ancestral anaeróbica. No fim, as bactérias citoplasmáticas tornaram-se as mitocôndrias e os cloroplastos de modernos eucariotos.



Fibras de actina de estresse
(a)

Microtúbulos
(b)

Filamentos intermediários
(c)

Figura 2-16 – Os três tipos de filamentos do citoesqueleto. Os painéis superiores mostram células epiteliais fotografadas depois do tratamento com anticorpos que se ligam e coram especificamente: (**a**) filamentos de actina enfeixados para formar "fibras de estresse"; (**b**) microtúbulos irradiando-se a partir do centro da célula; (**c**) filamentos intermediários que se estendem por toda a parte do citoplasma. Para esses experimentos, os anticorpos que especificamente reconhecem actina, tubulina ou proteínas do filamento intermediário estão covalentemente ligados a um composto fluorescente. Quando a célula é vista ao microscópio de fluorescência, apenas as estruturas coradas são visíveis. Os painéis inferiores mostram cada tipo de filamento como visualizado pela microscopia eletrônica de transmissão (**a**, **b**) ou microscopia eletrônica de varredura (**c**).

Cada um dos componentes do citoesqueleto é composto de subunidades protéicas simples que polimerizam para formar filamentos de espessura uniforme. Esses filamentos não são estruturas permanentes; sofrem constantes desmontagens em suas subunidades monoméricas e remontagens em filamentos. Sua localização nas células não é rigidamente fixa, mas pode alterar dramaticamente com a mitose, a citocinese ou alterações na forma da célula. Todos os tipos de filamentos se associam com outras proteínas que interligam filamentos entre si ou a outros, influenciam a montagem e a desmontagem ou movem organelas citoplasmáticas ao longo dos filamentos.

A proteína actina, virtualmente encontrada em todas as células eucariótica, na presença de ATP associa-se a polímeros não-covalentes linear, helicoidal, de 6 a 7nm de diâmetro, chamados **filamentos de actina** ou **microfilamentos** (Fig. 2-17). As células contêm uma variedade de proteínas as quais se ligam aos monômeros de actina ou filamentos e influenciam sua localização ou estado de agregação. A filamina e a fodrina interligam filamentos de actina entre si, estabilizando a rede e aumentando imensamente a viscosidade do meio onde os filamentos estão suspensos. Grande número de filamentos de actina se liga a proteínas específicas da membrana plasmática, situadas abaixo e mais ou menos paralelas à membrana plasmática, conferindo forma e rigidez à superfície celular (Fig. 2-16a).

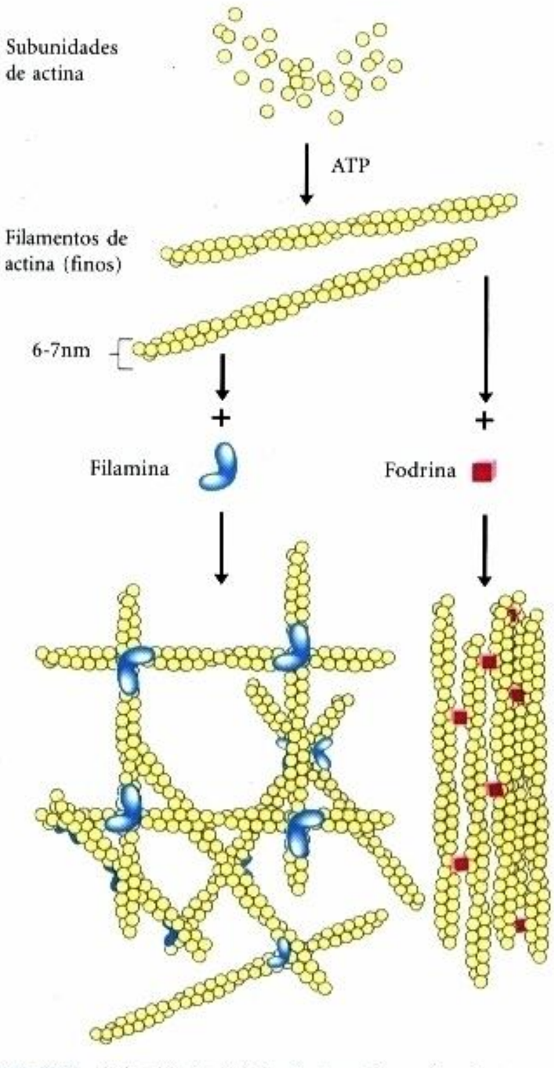


Figura 2-17 – Subunidades individuais de actina polimerizam-se para formar filamentos de actina. A proteína filamina mantém dois microfilamentos quando eles se cruzam em ângulo reto. A proteína fodrina forma ligações cruzadas entre os filamentos para criar agregados ou feixes lado a lado.

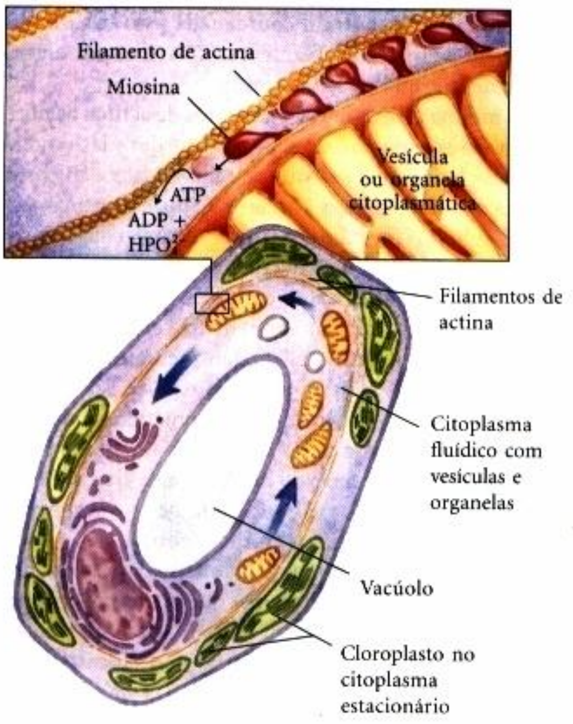

Filamento de actina
Miosina
ATP
ADP +
HPO$_4^{2-}$
Vesícula ou organela citoplasmática
Filamentos de actina
Citoplasma fluídico com vesículas e organelas
Vacúolo
Cloroplasto no citoplasma estacionário

Figura 2-18 – Transporte de organela. Moléculas de miosina movem-se ao longo dos filamentos de actina usando a energia do ATP. A corrente citoplasmática é produzida nas células gigantes da alga verde *Nitella* à medida que a miosina se move ao longo de um trajeto de filamentos de actina. O retículo endoplasmático, a mitocôndria, o núcleo e outras organelas associadas à membrana e às vesículas movem-se uniformemente ao longo da célula, de 50 a 75μm/s. Os cloroplastos estão localizados na camada do citoplasma estacionário que se situa entre os filamentos de actina e a membrana plasmática.

Os filamentos de actina ligam-se a uma família de proteínas chamadas de miosinas, moléculas-motor que convertem a energia química do ATP para trabalho mecânico movendo-se ao longo do filamento de actina em uma direção. Os membros mais simples dessa família, como a miosina I, possuem uma cabeça globular e uma cauda curta. A cabeça liga-se e move-se ao longo de um filamento de actina, impulsionada pela quebra do ATP (Fig. 2-18). A região caudal liga-se na membrana de uma organela citoplasmática, arrastando a organela à medida que a cabeça da miosina se move ao longo do filamento de actina. Esse movimento é facilmente visto nas células vivas, tais como as células gigantes da alga verde *Nitella*, em que organelas e vesículas se movem uniformemente ao longo da célula num processo chamado de corrente citoplasmática (Fig. 2-18). Esse movimento tem o efeito de misturar o conteúdo citoplasmático da enorme célula da alga mais eficientemente do que se ocorresse apenas pela difusão.

Uma forma de miosina maior é encontrada nos sistemas contráteis de uma vasta variedade de organismos, desde o mofo até o homem. Essa miosina também possui uma cabeça globular que se liga e se move ao longo dos filamentos de actina numa reação impulsionada pelo ATP; entretanto, ela tem uma cauda mais longa, que permite a associação de moléculas de miosina lado a lado para formar filamentos espessos (veja Fig. 7-30). Complexos de actina-miosina formam o anel contrátil que divide o citoplasma em dois durante a citocinese em todos os eucariotos. Em animais multicelulares, as células musculares são preenchidas com feixes altamente organizados de filamentos de actina (delgados) e filamentos de miosina (espessos), que produzem uma força contrátil coordenada pelo deslizamento impulsionado pelo ATP de filamentos de actina por entre os filamentos de miosina estacionários.

Da mesma forma que os filamentos de actina, os **microtúbulos** formam-se espontaneamente a partir das suas unidades monoméricas, entretanto a estrutura polimérica dos microtúbulos é um pouco mais complexa. Dímeros de duas proteínas semelhantes α e β-tubulina formam o microtúbulo oco, com cerca de 22nm de diâmetro. Nas células, a maioria dos microtúbulos sofre polimerização e despolimerização contínuas pela adição das subunidades de tubulina principalmente em uma extremidade e dissociação na outra. Os microtúbulos estão presentes por toda a parte no citoplasma, mas concentrados em regiões específicas em certos instantes. Por exemplo, após as cromátides irmãs se separarem e se moverem para pólos opostos de uma célula em divisão durante a mitose, um feixe de microtúbulos altamente organizados (o fuso mitótico) fornece a estrutura e provavelmente a força motora para a separação dos cromossomos filhos.

Os microtúbulos, como os filamentos de actina, associam-se com uma variedade de proteínas que se movem ao longo deles, formando pontes cruzadas, ou influenciando o estado de polimerização. A cinesina e a dineína citoplasmáticas, proteínas encontradas no citoplasma de muitas células, ligam-se aos microtúbulos e movem-se ao longo deles, usando a energia do ATP para impulsionar sua movimentação (Fig. 2-19). Cada proteína é capaz de se associar a organelas específicas e puxá-las ao longo do microtúbulo por longas distâncias a velocidades de cerca de 1μm/s. O movimento de bater dos cílios e flagelos eucarióticos também envolve a dineína e os microtúbulos.

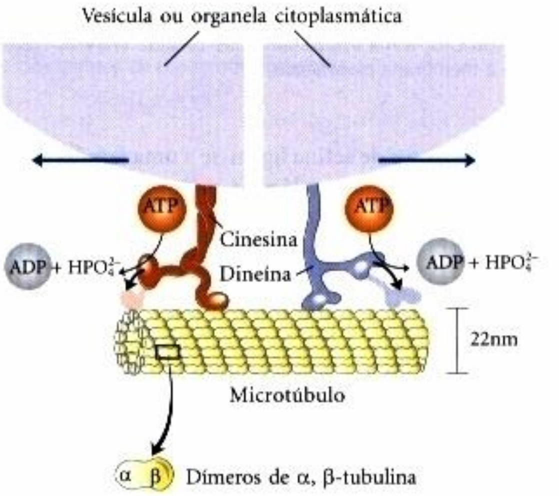


Figura 2-19 – Cinesina e dineína citoplasmática são motores moleculares, impulsionados pelo ATP que podem ligar-se a organelas ou vesículas citoplasmáticas que se movem ao longo dos "trilhos" microtubulares a uma velocidade de aproximadamente 1μm/s.

A contração do músculo esquelético, a ação propulsora dos cílios e flagelos e o transporte intracelular de organelas contam com o mesmo mecanismo fundamental: a quebra do ATP por proteínas como a cinesina, a miosina e a dineína impulsionando o movimento de deslizamento entre os microfilamentos e os microtúbulos.

Filamentos intermediários são uma família de estruturas com dimensões (diâmetro de 8 a 10nm) intermediárias entre os filamentos de actina e os microtúbulos. Vários tipos diferentes de subunidades de proteínas monoméricas formam reversivelmente os filamentos intermediários. A distribuição citoplasmática dessas estruturas é sujeita a alterações reguladas.

Uma função dos filamentos intermediários é fornecer apoio mecânico interno para a célula e para o posicionamento das organelas. Por exemplo, a vimetina é a subunidade monomérica dos filamentos intermediários encontrados nas células endoteliais, que revestem os vasos sangüíneos, e nos adipócitos (células gordurosas). Fibras de vimetina parecem ancorar o núcleo e as gotículas de gordura em localizações celulares específicas. Os filamentos intermediários compostos de queratinas, uma família de proteínas estruturais, são particularmente proeminentes em certas células epidérmicas dos vertebrados e formam uma rede cruzada covalentemente, que persiste mesmo depois que as células morrem. Cabelo, unhas e penas estão entre as estruturas compostas principalmente por queratinas.

O citoplasma é abarrotado, altamente ordenado e dinâmico

A imagem que emerge deste breve resumo é o de uma célula eucariótica com um citoplasma ziguezagueado por uma rede de fibras estruturais, por meio das quais se estende um sistema complexo de compartimentos envoltos por membranas (Fig. 2-7). Tanto os filamentos quanto as organelas são dinâmicos: os filamentos desmontam-se e montam-se em qualquer lugar; as vesículas membranosas brotam de uma organela, movem-se e ligam-se a outras. As organelas movem-se através do citoplasma ao longo de filamentos protéicos, puxados pela cinesina, dineína citoplasmática, miosina e talvez outras proteínas semelhantes. Exocitose e endocitose fornecem vias entre o interior da célula e o meio circundante, permitindo a secreção de proteína e outros componentes produzidos dentro da célula e a captação de componentes extracelulares.

Embora complexa, essa organização do citoplasma está longe do acaso. A movimentação e o posicionamento das organelas e elementos do citoesqueleto estão sob severa regulação e, em certas etapas na vida de uma célula eucariótica, reorganizações finamente orquestradas ocorrem, tais como os eventos da mitose. As interações entre o citoesqueleto e as organelas são não-covalentes, reversíveis e sujeitas à regulação em resposta a vários sinais intra e extracelulares.

O Estudo de Componentes Celulares

As organelas podem ser isoladas por centrifugação

Um grande avanço no estudo bioquímico das células foi o desenvolvimento de métodos para a separação das organelas do citosol e entre si. Em um fracionamento celular típico, as células ou tecidos são rompidos por homogeneização cuidadosa em um meio contendo sacarose (cerca de 0,2M). Esse tratamento rompe a membrana plasmática, mas deixa a maioria das organelas intactas. (A sacarose cria um meio com uma pressão osmótica semelhante àquela das organelas, isso previne a difusão de água para dentro das organelas, o que as faria inchar, romper e extravasar seu conteúdo.)

Organelas, como os núcleos, as mitocôndrias e os lisossomos, diferem em tamanho e, portanto, sedimentam com velocidades diferentes durante a centrifugação. Elas também diferem na gravidade específica e "flutuam" em diferentes níveis em um gradiente de densidade (Fig. 2-20). A centrifugação diferencial leva a um fracionamento grosseiro do conteúdo citoplasmático, que deve ser posteriormente purificado por centrifugação isopícnica ("mesma densidade"). Nesse procedimento, organelas de diferentes densidades de flutuação (resultado das proporções diferentes de lipídios e proteínas em cada tipo de organela) são separadas em um gradiente de densidade. Pela remoção cuida-

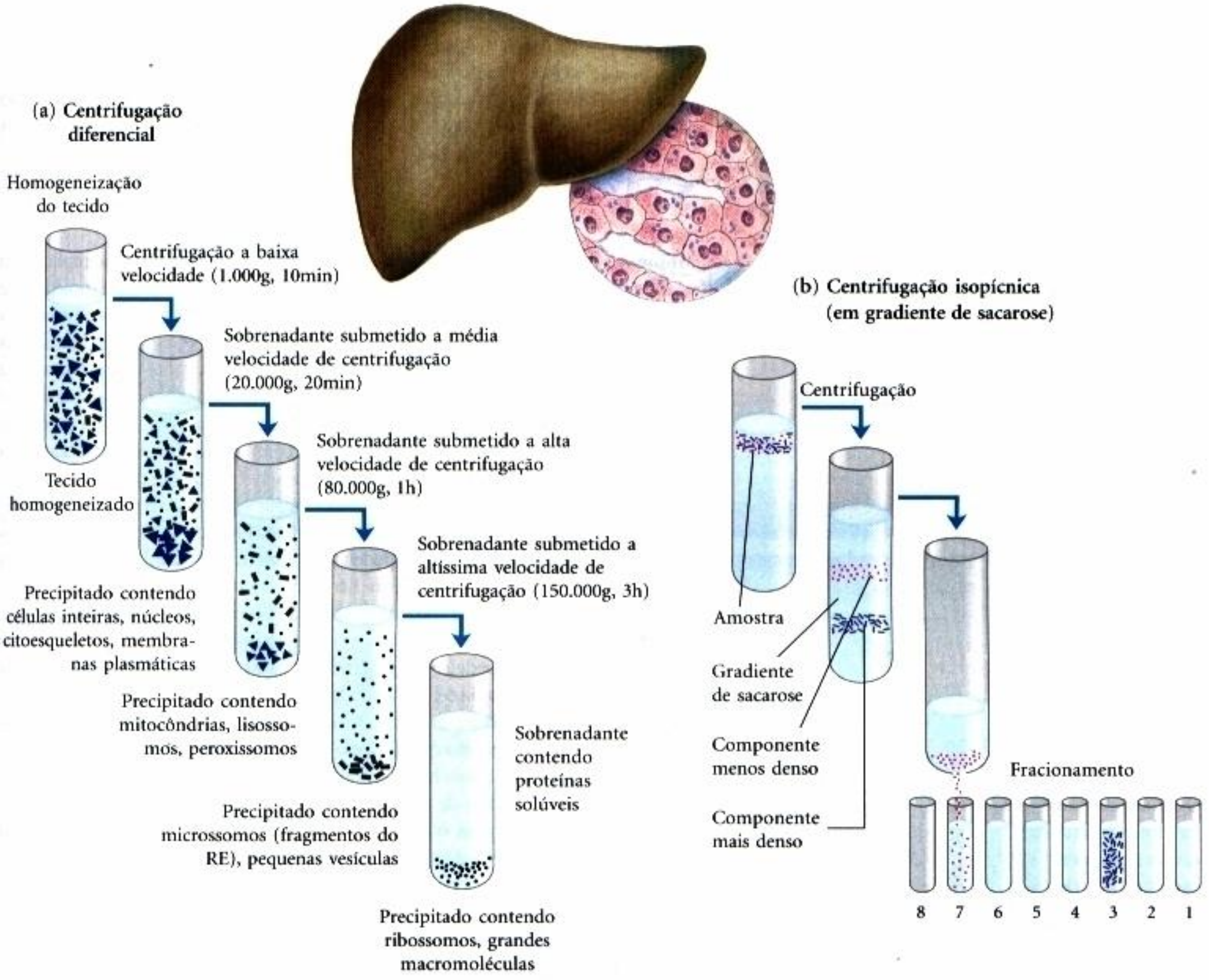

(a) Centrifugação diferencial
Homogeneização do tecido
Centrifugação a baixa velocidade (1.000g, 10min)
Tecido homogeneizado
Sobrenadante submetido a média velocidade de centrifugação (20.000g, 20min)
Precipitado contendo células inteiras, núcleos, citoesqueletos, membranas plasmáticas
Sobrenadante submetido a alta velocidade de centrifugação (80.000g, 1h)
Precipitado contendo mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos
Sobrenadante submetido a altíssima velocidade de centrifugação (150.000g, 3h)
Precipitado contendo microssomos (fragmentos do RE), pequenas vesículas
Sobrenadante contendo proteínas solúveis
Precipitado contendo ribossomos, grandes macromoléculas
(b) Centrifugação isopícnica (em gradiente de sacarose)
Centrifugação
Amostra
Gradiente de sacarose
Componente menos denso
Componente mais denso
Fracionamento
8
7
6
5
4
3
2
1

Figura 2-20 – Fracionamento subcelular de um tecido. Um tecido como o fígado é homogeneizado mecanicamente para romper as células e dispersar seu conteúdo em um tampão aquoso. As partículas grandes e pequenas nessa suspensão podem ser separadas por centrifugação em diferentes velocidades (**a**), ou as partículas de diferentes densidades podem ser separadas por centrifugação isopícnica (**b**). Na centrifugação isopícnica, um tubo de centrifuga é preenchido com uma solução, cuja densidade aumenta do topo para a base; alguns solutos, como a sacarose, são dissolvidos em concentrações diferentes para produzir esse gradiente de densidade. Quando a mistura das organelas é colocada no topo do gradiente de densidade e o tubo é centrifugado em alta velocidade, as organelas sedimentam individualmente até que a sua densidade de flutuação se iguale exatamente àquela no gradiente. Cada camada pode ser coletada separadamente.

dosa do material de cada região do gradiente e observação por meio de um microscópio, o bioquímico pode estabelecer a posição de cada organela e obter organelas purificadas para estudos posteriores. Dessa forma, foi estabelecido, por exemplo, que os lisossomos contêm enzimas degradativas, as mitocôndrias contêm enzimas oxidativas e os cloroplastos contêm os pigmentos fotossintetizantes. O isolamento de uma organela enriquecida com uma certa enzima é freqüentemente o primeiro passo na purificação dessa enzima.

Estudos *in vitro* podem oferecer uma visão geral de importantes interações entre as moléculas

Uma das abordagens mais efetivas para entender um processo biológico é estudar moléculas individuais purificadas como enzimas, ácidos nucléicos ou proteínas estruturais. Os componentes purificados são apropriados à caracterização minuciosa *in vitro*, suas propriedades físicas e atividades catalíticas podem ser estudadas sem "interferência" de outras moléculas presentes na célula intacta. Embora essa abordagem tenha sido notavelmente reveladora, sempre deve ser lembrado que o interior de uma célula é bem diferente do interior de um tubo de ensaio. Os componentes "interferentes" eliminados pela purificação podem ser críticos à função ou à regulação biológica da molécula purificada. Estudos *in vitro* de enzimas puras são comumente realizados em concentrações de enzimas muito baixas, em soluções aquosas homogêneas. Na célula, uma enzima está dissolvida ou suspensa num citoplasma gelatinoso com milhares de outras proteínas, algumas das quais se ligam àquela enzima e influenciam sua atividade. Dentro das células, algumas enzimas são parte de complexos multienzimáticos, nos quais os reagentes são canalizados de uma enzima para outra sem nunca entrar na massa do solvente. A difusão é atrapalhada num citoplasma gelatinoso e a composição citosólica varia em diferentes regiões da célula. Em resumo, uma certa molécula pode funcionar diferentemente dentro da célula e *in vitro*. Um dos principais desafios da bioquímica é compreender a influência da organização celular e das associações macromoleculares na função de enzimas individuais — para entender a função *in vivo*, bem como *in vitro*.

Evolução dos Organismos Multicelulares e de Diferenciação Celular

Todos os eucariotos unicelulares modernos — os protistas — contêm as organelas e os mecanismos que descrevemos, indicando que essas organelas e mecanismos devem ter se originado relativamente cedo. Os protistas são extraordinariamente versáteis. O protista ciliado *Paramecium,* por exemplo, move-se rapidamente nas suas vizinhanças aquosas batendo seus cílios; percebe estímulos mecânicos, químicos e térmicos do seu ambiente e responde alterando o seu caminho; encontra, engolfa e digere uma variedade de organismos como alimento e excreta os fragmentos não digeridos; elimina o excesso de água que vasa por sua membrana e encontra e acasala-se com parceiros sexuais. Entretanto, o ser unicelular tem suas desvantagens. O *Paramecium* provavelmente vive numa pequena região da lagoa onde sua vida começou, pelo fato de sua motilidade ser limitada pela pequena capacidade dos seus cílios microscópicos e de sua habilidade em detectar um ambiente melhor a distância ser limitada pelo pequeno alcance do seu aparelho sensorial.

Em alguma etapa posterior da evolução, os organismos unicelulares descobriram a vantagem de se agregar, adquirindo portanto maior motilidade, eficiência ou sucesso reprodutivo do que os seus competidores unicelulares de vida livre. A evolução posterior de tais organismos aglutinados levou às associações permanentes entre células individuais e eventualmente à especialização dentro da colônia — a diferenciação celular.

As vantagens da especialização celular levaram à evolução de organismos mais complexos e altamente diferenciados, nos quais algumas células desempenham funções sensoriais, outras digestivas, fotossintetizantes ou reprodutoras. Muitos organismos multicelulares modernos contêm centenas de diferentes tipos celulares, cada um especializado em alguma função que apóia o organismo inteiro. Mecanismos fundamentais que surgiram anteriormente foram refinados e complementados posteriormente durante a evolução. O mecanismo simples responsável pela movimentação da miosina ao longo dos filamentos de actina no mofo foi conservado e elaborado nas células musculares dos vertebrados. A mesma estrutura básica e o mesmo mecanismo que sustenta a movimentação do bater dos cílios do *Paramecium* e dos flagelos na *Chlamydomonas* são empregados na célula altamente diferenciada dos vertebrados, o espermatozóide. A Figura 2-21 ilustra algumas das especializações celulares encontradas nos organismos multicelulares.

As células individuais de um organismo multicelular permaneceram delimitadas por suas membranas plasmáticas, mas desenvolveram estruturas especializadas de superfície para a fixação e comunicação com outras (Fig. 2-22). Cada tipo de junção intercelular é reforçada por proteínas de membrana ou filamentos do citoesqueleto. Os animais têm três tipos de junções que servem a propósitos diferentes. Nas **junções apertadas** ("tight junctions"), as membranas plasmáticas de células epiteliais adjacentes estão intimamente juntas, sem nenhum fluido extracelular separando-as. As junções apertadas formam um cinturão ao redor da célula, constituindo uma barreira entre o tecido e o ambiente externo. Os **desmossomos** são placas fibrosas que mantêm as células epiteliais juntas; o pequeno espaço extracelular entre elas é preenchido por proteínas fibrosas e aderentes. Os desmossomos mecanicamente fornecem resistência às conexões físicas entre as células, mas não impedem a passagem de material através do espaço extracelular entre as células por eles conectadas. Os **canais juncionais** ("gap junctions") fornecem pequenas aberturas reforçadas entre as células, através das quais correntes elétricas, íons e moléculas pequenas podem passar. Eles servem como canais de comunicação entre as células adjacentes. As plantas superiores possuem os **plasmodesmata** (singular, plasmodesma) os quais formam canais que se assemelham aos canais juncionais, mas estruturalmente são completamente diferentes, em parte por causa da presença da parede celular das plantas. Os plasmodesmata fornecem um caminho através da parede celular e membrana plasmática para a movimentação de metabólitos e até mesmo algumas proteínas pequenas entre as células adjacentes.

Vírus: Parasitas das Células

Os **vírus** são complexos supramoleculares que podem se replicar em células hospedeiras apropriadas. Eles consistem de uma molécula de ácido nucléico (DNA ou RNA), molécula envolvida por uma capa protetora, ou capsídeo, feita de moléculas protéicas e em alguns casos de um envelope membranoso. Os vírus existem em dois estados. Fora das células hospedeiras que os formam, os vírus são simplesmente partículas não vivas chamadas de **vírions**, os quais podem ser cristalizados. Assim que um vírus ou seu componente ácido nucléico entra numa célula hospedeira específica, ele se torna um parasita intracelular. O ácido nucléico viral transporta a mensagem genética especificando a estrutura do vírion intacto. Ele desvia os ribossomos e as enzimas da célula hospedeira das suas funções celulares normais para a construção de muitas novas partículas virais filhas. Em conseqüência, uma progênie de centenas de vírus pode se originar de apenas um vírion que infecta uma célula hospedeira. Em alguns sistemas vírus-hospedeiro, a progênie do vírion escapa através da membrana plasmática da célula hospedeira. Outros vírus produzem a lise celular (quebra da membrana e morte da célula hospedeira) quando são liberados. Muito da patologia associada com as doenças virais resulta da lise da célula hospedeira.

Um tipo de resposta diferente ocorre em algumas infecções virais, nas quais o DNA viral se torna integrado no cromossomo do hospedeiro e é replicado com os genes do próprio hospedeiro. Genes virais integrados podem ter pouco ou nenhum efeito na sobrevivência do hospedeiro, entretanto, em casos raros, eles produzem profundas alterações na aparência e na atividade da célula hospedeira.

Muitas centenas de diferentes vírus são conhecidos (Fig. 2-23), sendo cada um mais ou menos específico para uma célula hospedeira, que pode ser uma célula animal, de planta ou bacteriana. Vírus específicos para bactérias são conhecidos como **bacteriófagos**, ou simplesmente **fagos** (do grego *phagein,* "comer"). Alguns vírus contêm apenas uma espécie de proteína no seu capsídeo — o vírus do mosaico do tabaco, por exemplo, um vírus de planta simples e o primeiro a ser cristalizado. Outros vírus contêm centenas de diferentes espécies de proteínas. Alguns desses vírus grandes e complexos foram cristalizados e minúcias de suas estruturas moleculares são conhecidas. Os vírus diferem enormemente em tamanho. O bacteriófago ϕX174, um dos menores, possui diâmetro de 18nm. O vírus da vaccínia é um dos maiores, seu vírion é quase tão grande quanto uma bactéria pequena. Os vírus também diferem na forma e na complexidade estrutural. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é de estrutura relativamente simples, mas devastador na sua ação; causa a AIDS destruindo as células centrais do sistema imune dos humanos. A epidemia de Hantavirus no sudoeste dos Estados Unidos em 1993 e do vírus Ebola na África central em 1995 ilustra a extrema patogenicidade de alguns vírus. Ambas as viroses produzem doenças com andamento rápido e alta mortalidade. Outros vírus que são altamente patogênico para o homem causam a poliomielite, influenza, herpes, hepatite, resfriado comum, mononucleose infecciosa, herpes-zóster e certos tipos de câncer.

A Bioquímica tem ganho enormemente com o estudo dos vírus, que tem fornecido informação nova sobre a estrutura do genoma, os mecanismos enzimáticos da síntese dos ácidos nucléicos e de proteínas e a regulação do fluxo da informação genética.

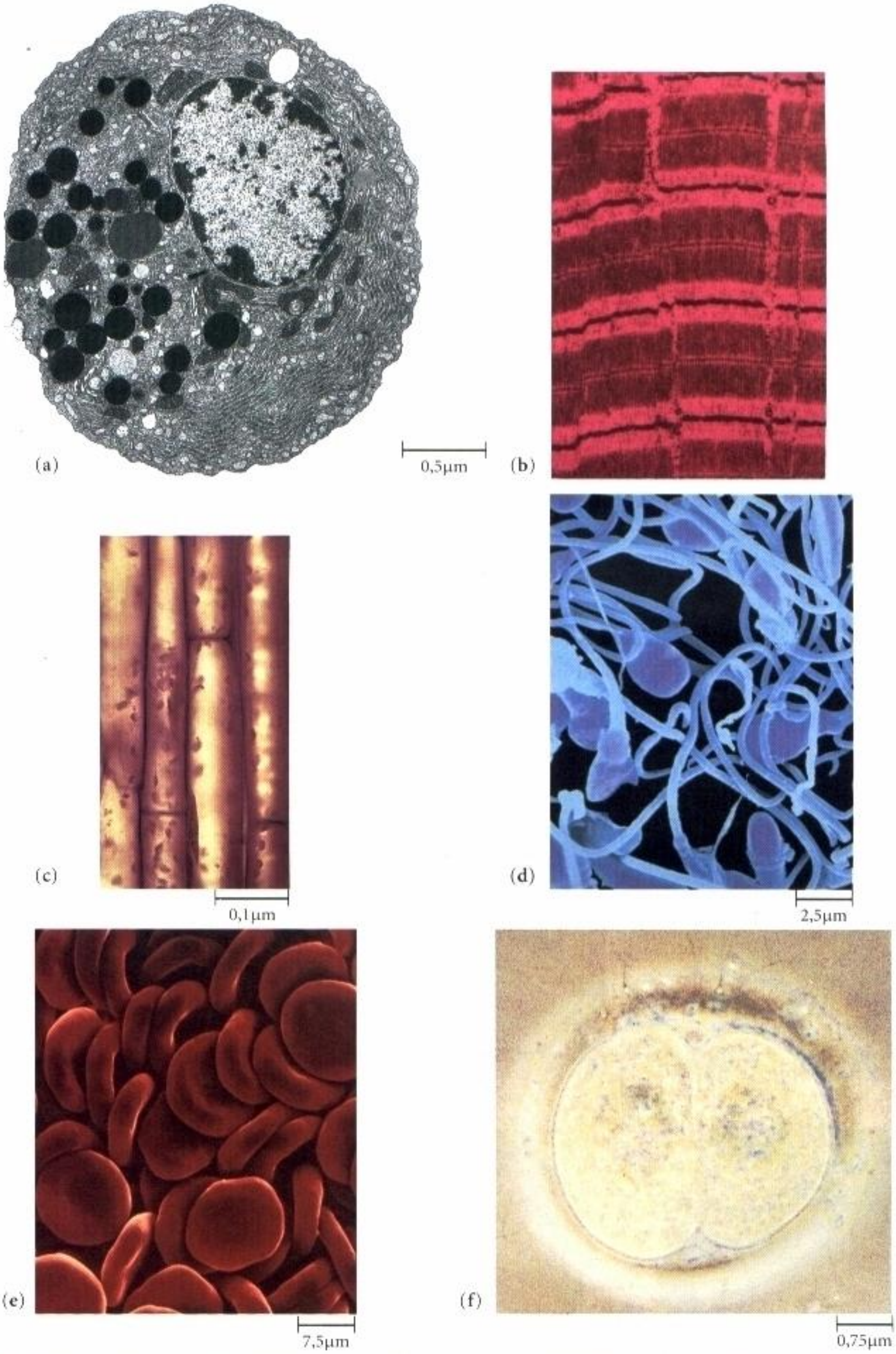


Figura 2-21 – Uma galeria de células estrutural e funcionalmente diferenciadas. (**a**) Células secretórias do pâncreas. Seu extenso retículo endoplasmático é o local da síntese das proteínas secretadas. (**b**) Porção de uma célula de músculo esquelético (cor artificial). Os filamentos altamente organizados de actina e miosina deslizando um ao outro num processo dependente de ATP que produz contração muscular macroscópica. (**c**) Células do colênquima de um caule de planta. Essas células, sem uma rígida parede celular, produzem um suporte flexível para o crescimento do caule. (**d**) Células do espermatozóide humano (cor artificial). O flagelo longo impulsiona o espermatozóide através do trato reprodutivo da fêmea em direção ao óvulo. (**e**) Eritrócitos humano maduros (cor artificial). Essas células não têm núcleo ou sistema de endomembrana; cada célula contém o oxigênio solúvel ligado à hemoglobina, com flexibilidade suficiente para penetrar em capilares de pequeno diâmetro. (**f**) Embrião humano no estágio de duas células. A célula ovo a partir da qual ele foi originado foi empacotada com combustível armazenado e RNA mensageiro para suportar a rápida síntese protéica que se segue após a fertilização.

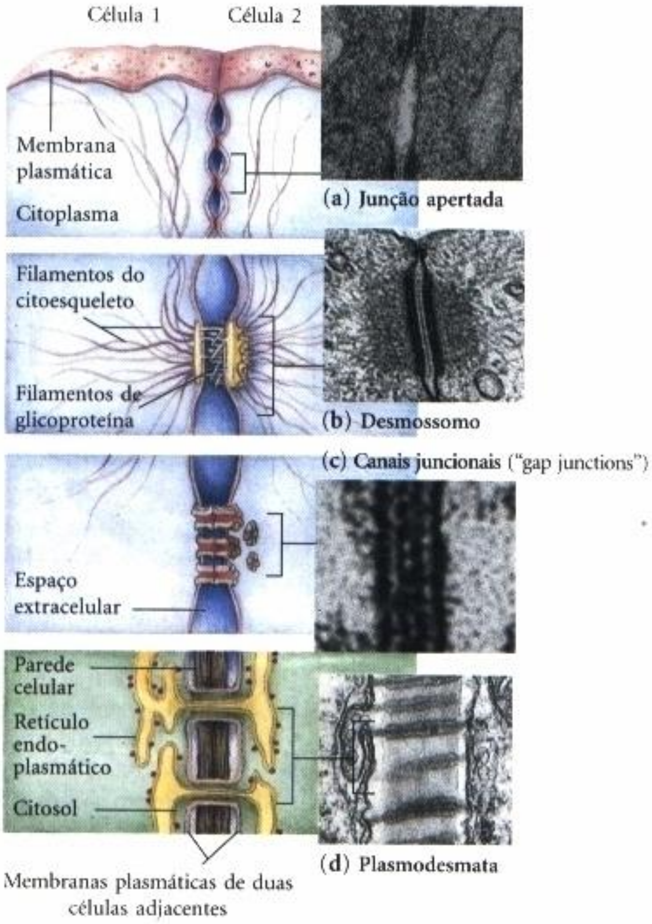

Célula 1
Célula 2
Membrana plasmática
Citoplasma
(a) Junção apertada
Filamentos do citoesqueleto
Filamentos de glicoproteína
(b) Desmossomo
(c) Canais juncionais ("gap junctions")
Espaço extracelular
Parede celular
Retículo endo-plasmático
Citosol
(d) Plasmodesmata
Membranas plasmáticas de duas células adjacentes

Figura 2-22 – Conexões celulares. As células animais podem ser mantidas por três tipos de junções entre as células. (**a**) Junções apertadas produzem uma selagem entre células epiteliais adjacentes. (**b**) Desmossomos soldam células epiteliais adjacentes e são reforçados por vários elementos do citoesqueleto. (**c**) Canais de junção permitem que íons e correntes elétricas fluam entre células adjacentes. (**d**) Em plantas, plasmodesmata conectam células adjacentes, fornecendo um caminho através da parede celular para a passagem de pequenos metabólitos e proteínas.

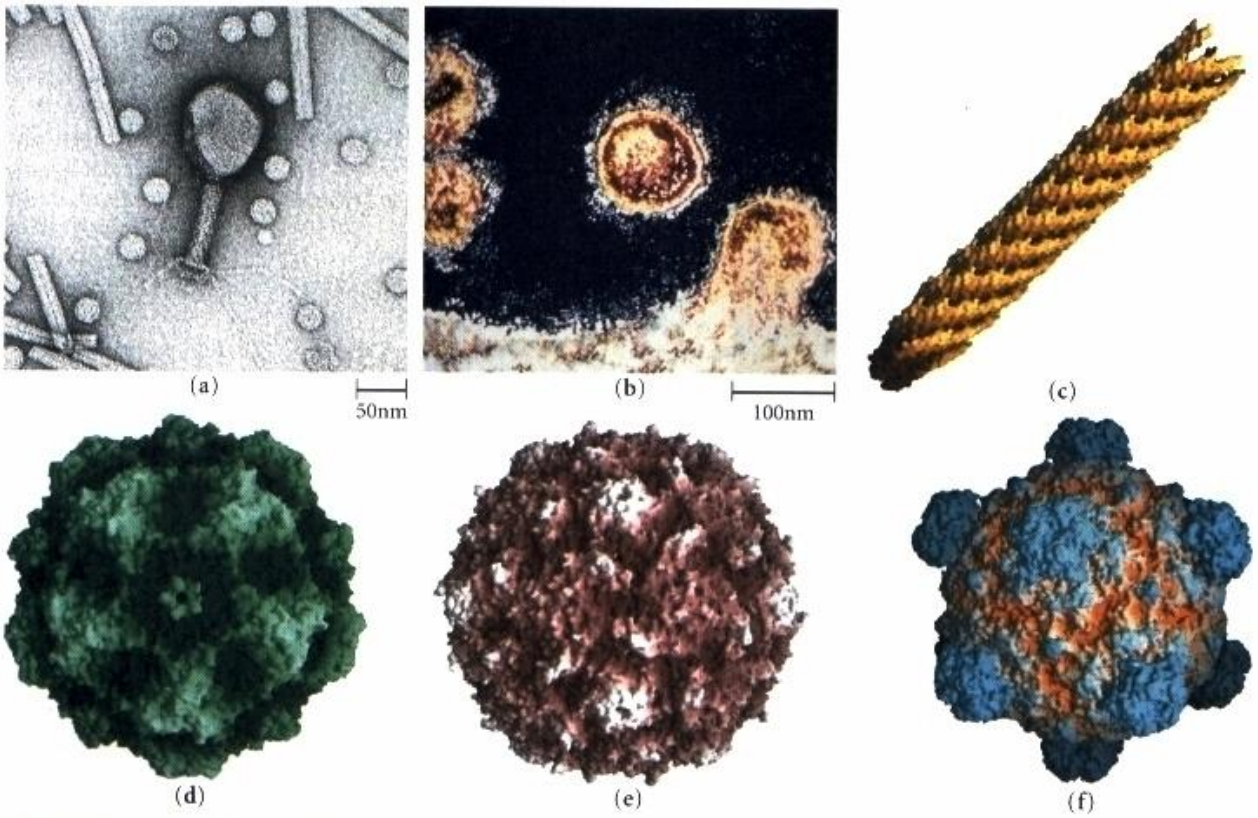

(a)
50nm
(b)
100nm
(c)
(d)
(e)
(f)

Figura 2-23 – Uma galeria de vírus. (**a**) Micrografia eletrônica mostrando o vírus do mosaico amarelo do nabo (partículas esféricas, pequenas), vírus do mosaico do tabaco (cilindros longos) e bacteriófago T4 (com a forma de um espelho de mão). (**b**) Micrografia eletrônica (cor artificial) mostrando o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o agente causador da AIDS, saindo de um linfócito T infectado do sistema imune. (**c**) Modelo molecular da superfície do fago filamentoso fd. (**d**) Modelo molecular da superfície do parvovírus canino, um problema de saúde sério para cães não vacinados. (**e**) Modelo molecular da superfície do poliovírus humano (tipo 2), um picornavírus. A vacinação em larga escala tem quase eliminado o poliovírus como um problema de saúde para o homem. (**f**) Modelo molecular da superfície do bacteriófago ϕX174.

Resumo

As células, unidades estruturais e funcionais dos organismos vivos, são de dimensões microscópicas. Seu pequeno tamanho, combinado com convoluções da sua superfície, produz altas razões entre a superfície e o volume, facilitando a difusão de combustíveis, nutrientes e produtos residuais entre a célula e seus arredores. Todas as células compartilham certas características: DNA contendo a informação genética, ribossomos e uma membrana plasmática que envolve o citoplasma. Nos eucariotos, o material genético é envolto por um envelope nuclear; os procariotos não possuem essa membrana.

A membrana plasmática é uma barreira de permeabilidade, firme e flexível, que contém numerosos transportadores, bem como receptores para uma variedade de sinais extracelulares. O citoplasma de células eucarióticas consiste de citosol e organelas. O citosol é uma solução concentrada de proteínas, RNA, intermediários metabólicos, co-fatores e íons inorgânicos. Os ribossomos são complexos supramoleculares nos quais ocorre a síntese protéica; os ribossomos bacterianos são um pouco menores que aqueles das células eucarióticas, mas são semelhantes na estrutura e na função.

Certos organismos, tecidos e células oferecem vantagens para os estudos bioquímicos. A *E. coli* e a levedura podem ser cultivadas em grandes quantidades, possuem tempo de geração curto e são especialmente apropriadas à manipulação genética. As funções especializadas do fígado, do músculo, do tecido adiposo e dos eritrócitos os tornam atraentes para o estudo de processos específicos.

As primeiras células vivas foram os procariotos e anaeróbicos; eles provavelmente surgiram cerca de 3,5 bilhões de anos atrás, quando a atmosfera era desprovida de oxigênio. Com a passagem do tempo, a evolução biológica conduziu as células capazes de produzir fotossíntese, com o O_2 como subproduto. À medida que o O_2 se acumulava, surgiam células procarióticas capazes de produzirem oxidação aeróbica dos combustíveis. Os dois principais grupos de procariotos — eubactérias e arqueobactérias — divergiram cedo na evolução. O envelope celular de alguns tipos de bactérias incluem camadas fora da membrana plasmática, que fornecem rigidez ou proteção. Algumas bactérias possuem flagelo para a propulsão. O citoplasma das bactérias não contém organelas envoltas por membrana, mas contém ribossomos e grânulos de nutrientes, bem como um nucleóide que contém todo o DNA da célula. Algumas bactérias fotossintetizantes possuem extensas membranas intracelulares que contêm pigmentos captadores da luz.

Cerca de 1,5 bilhão de anos atrás surgiram as células eucarióticas. Elas eram maiores do que as procarióticas e o seu material genético era mais complexo. Essas células iniciais estabeleceram relações simbióticas com os procariotos que viviam no seu citoplasma; as mitocôndrias e os cloroplastos modernos são derivados desses endossimbiontes primitivos. As mitocôndrias e os cloroplastos são organelas intracelulares envoltas por uma dupla membrana. Eles são os principais sítios da síntese do ATP nas células eucarióticas aeróbicas. Os cloroplastos são encontrados apenas nos organismos fotossintetizantes, entretanto as mitocôndrias são ubíquas entre os eucariotos.

As células eucarióticas modernas possuem um sistema complexo de membranas intracelulares. Esse sistema de endomembranas consiste de envelope nuclear, retículos endoplasmáticos liso e rugoso, complexo de Golgi, vesículas de transporte, lisossomos e endossomos. Proteínas sintetizadas nos ribossomos ligados ao endoplasmático rugoso passam para o sistema endomembranoso, percorrendo o complexo de Golgi no seu trajeto para atingir as organelas ou para a superfície celular, nas quais serão secretadas por exocitose. A endocitose traz materiais extracelulares para dentro da célula, onde podem ser digeridos por enzimas digestivas nos lisossomos. Nas plantas, o vacúolo central é o sítio dos processos degradativos, ele também funciona como um depósito de armazenamento de pigmentos e outros produtos metabólicos e mantém o turgor celular.

O material genético nas células eucarióticas está organizado nos cromossomos, complexos altamente organizados de DNA e proteínas histônicas. Antes da divisão celular (citocinese), cada cromossomo é replicado e estes são separados pelo processo da mitose.

O citoesqueleto é uma rede intracelular de filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários de vários tipos. O citoesqueleto confere forma à célula, e a reorganização dos filamentos do citoesqueleto resulta nas alterações de forma que acompanham o movimento amebóide e a divisão celular. As organelas intracelulares movem-se ao longo dos filamentos do citoesqueleto, propelidas por proteínas como a cinesina, a dineína citoplasmática e a miosina, usando a energia do ATP. Os bioquímicos usam a centrifugação diferencial e a centrifugação isopícnica para isolar componentes subcelulares para estudo.

Nos organismos multicelulares há uma divisão de trabalho entre os vários tipos de células. As células individuais em animais são unidas entre si mecanicamente por junções apertadas e desmossomos; canais de comunicação são fornecidos pelos canais juncionais (em animais) e pelos plasmodesmata (em plantas). Os vírus são parasitas das células vivas capazes de subverter a maquinaria celular para a sua própria replicação. Eles infectam células bacterianas, plantas e animais e são responsáveis por uma variedade de sérias doenças humanas.

Leitura Adicional

Geral

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Watson JD. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edn, Garland Publishing, Inc., New York.

Um livro-texto soberbo sobre estrutura e função celular, cobrindo os tópicos considerados neste capítulo e um referencial útil para muitos capítulos seguintes.

Becker WM, Reece JM, & Peonie MF. (1995) *The World of the Cell*, 3rd edn, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.

Um excelente livro-texto introdutório de biologia celular.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, & Darnell J. (1995) *Molecular Cell Biology*, 3rd edn, Scientific American Books, Inc., New York.

Como o livro de Alberts e co-autores, um texto soberbo, útil para este e outros capítulos.

Margulis L. (1996) Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1071-1076.

Os argumentos para a divisão de todas as criaturas vivas em cinco reinos: Monera, Protista, Animalia, Planta.

Margulis L, Gould SJ, Schwartz KV, & Margulis AR. (1998) *Five Kingdoms: An Ilustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, 3rd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Descrição de todos os maiores grupos de organismos, lindamente ilustrados com micrografias eletrônicas e desenhos.

Purves WK, Orians GH, Heller HC, & Sadava D. (1998) *Life: The Science of Biology*, 5th edn, Sinauer Associates, Inc., and W.H. Freeman and Company, New York.

Um livro-texto de biologia geral, bem escrito, bem ilustrado e atualizado.

Estrutura das células, organelas e citoesqueleto

Block SM. (1998) Leading the procession: new insights into kinesin motors. *J. Cell Biol.* **140**, 1281-1284.

Fawcett DW & Jensh RO (eds). (1997) *Bloom and Fawcett: Concise Histology*, Chapman & Hall, London.

Um livro-texto bem ilustrado da estrutura da célula em nível microscópico.

Frontiers in Cell Biology: The Cytoskeleton. (1998) *Science* **279**, 509-533.

Esse volume especial inclui os seguintes artigos:

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton (pp. 509-514); **Fuchs E & Cleveland DW.** A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease (pp. 514-519); **Hirokawa N.** Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport (pp. 519-526); **Mermall V, Post PL, & Mooseker MS.** Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction (pp. 527-533).

Gelfand V & Bershadsky AD. (1991) Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 93-116.

Organization of the Cytoplasm. (1981) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **46.**

Mais de 90 excelentes artigos sobre microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermediários e seus papéis biológicos.

Rothman JE & Orci L. (1996) Budding vesicles in living cells. *Sci. Am.* 274 (March), 70-75.

Uma descrição clara da dinâmica do sistema de endomembranas.

Schroer TA & Sheetz MP. (1991) Functions of microtubule-based motors. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 629-652.

Spudich JA. (1996) Structure-function analysis of the motor domain of myosin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 543-573.

Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, & Nakanishi H. (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 227-231.

Revisão curta da evidência de que a pequena proteína Rho ligante de GTP controla a montagem e a estrutura dos filamentos de actina.

Vale RD & Fletterick RJ. (1997) The design plan of kinesin motors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 745-777.

Detalhada revisão da estrutura e de mecanismos dos motores moleculares na superfamília cinesina.

Evolução das células

de Duve C. (1995) The beginnings of life on earth. *Am. Sci.* **83**, 428-437.

Um cenário para a sucessão dos passos químicos que levaram aos primeiros organismos vivos.

de Duve C. (1996) The birth of complex cells. *Sci. Am.* **274** (April), 50-57.

Dyer BD & Obar RA. (1994) *Tracing the History of Eukaryotic Cells: The Enigmatic Smile*, Columbia University Press, New York.

Fenchel T & Finlay BJ. (1994) The evolution of life without oxygen. *Am. Sci.* **82**, 22-29.

Discussão da hipótese endossimbiótica na luz dos modernos organismos endossimbiontes anaeróbicos.

Knoll AH. (1991) End of the proterozoic eon. *Sci. Am.* **265** (October), 64-73.

Discussão da evidência de que um aumento no nível de oxigênio atmosférico levou ao desenvolvimento dos organismos multicelulares, incluindo os grandes animais.

Lazcano A & Miller SL. (1994) How long did it take for life to begin and envolve to cyanobacteria? *J. Mol. Evol.* **39**, 546-554.

Lazcano A & Miller SL. (1996) The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* **85**, 793-798.

Breve revisão de recentes desenvolvimentos em estudos da origem da vida: atmosfera primitiva, ventos submarinos, origem autotrófica *versus* heterotrófica, o mundo do RNA e pré-RNA e o tempo exigido para o surgimento da vida.

Margulis L. (1992) *Symbiosis in Cell Evolution: Microbial Evolution in the Archean and Proterozoic Eons*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Discussão clara da hipótese de que as mitocôndrias e os cloroplastos são descendentes das bactérias; todas as células eucarióticas surgiram a partir de simbioses microbianas.

Martin W & Mueller M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37-41.

Uma nova hipótese interessante para a origem das células eucarióticas, baseada na bioquímica comparativa do metabolismo energético. Ela postula que as células eucarióticas surgiram da fusão de uma eubactéria produtora de H_2 com uma arqueobactéria rigorosamente dependente de H_2.

Schopf JW. (1992) *Major Events in the History of Life*, Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Vidal G. (1984) The oldest eukaryotic cell. *Sci. Am.* **250** (February), 48-57.

Relações entre Arqueo e Eubacteria

Brow JR & Doolittle WF. (1997) Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 456-502.

Uma discussão muito completa dos argumentos para colocar a Arqueo sobre o ramo filogenético que levou aos organismos multicelulares.

Keeling PJ & Doolittle WF. (1995) Archaea: narrowing the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5761-5764.

Madigan T & Marris BL. (1997) Extremophiles. *Sci. Am.* **276** (April), 82-87.

Uma contribuição bioquímica de arqueobactérias que vivem onde é mais quente, mais frio, mais salino, mais ácido e mais alcalino.

Revisões sobre a Arqueo. (1997) *Cell* **89**.

Esse volume contém cinco revisões da bioquímica e genômica da Arqueo e suas relações com os eucariotos: **Olsen GJ & Woese CR**, Archaeal genomics: an overview (pp. 991-994); **Edgell DR & Doolittle WF**, Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins (pp. 995-998); **Reeve JN, Sandman K, & Daniels CJ**, Archaeal histones, nucleosomes, and transcription initiation (pp. 999-1002); **Belfort M & Weiner A**, Another bridge between kingdoms: tRNA splicing in Archaea and Eukaryotes (pp. 1003-1006); **Dennis PP**, Ancient ciphers: translation in Archaea (pp. 1007-1010).

Problemas

A seguir alguns problemas sobre o conteúdo do capítulo. Eles envolvem relações numéricas e geométricas simples que tratam das atividades e estrutura da célula. (Resolvendo os problemas ao final do capítulo, você pode desejar referir-se às tabelas impressas na contracapa.) Cada problema possui um título para fácil referência e discussão.

1. O tamanho das células e seus componentes

(a) Se você for aumentar uma célula 10.000 vezes (o que é um aumento típico encontrado usando um microscópio), em que tamanho ela aparecerá? Assuma que você está olhando uma célula eucariótica "típica" com um diâmetro celular de 50 microns.

(b) Se essa célula for uma célula muscular, quantas moléculas de actina estarão presentes, assumindo que não há outros componentes celulares presentes? (As moléculas de actina são esféricas com um diâmetro de 3,6nm; assumindo a célula muscular esférica. O volume de uma esfera é dado por $4/3\ \pi r^3$.)

(c) Se essa for uma célula do fígado com as mesmas dimensões, quantas mitocôndrias ela possui assumindo que não exista outros componentes celulares? (Assumindo a célula do fígado esférica. O volume de uma esfera é dado por $4/3\pi r^3$.)

(d) A glicose é o principal nutriente produtor de energia para a maioria das células. Assumindo que ela está presente numa concentração de 1mM, calcular quantas moléculas de glicose estarão presentes em nossa hipotética (e esférica) célula eucariótica? (O número de Avogadro, número de moléculas em 1 mol de uma substância não ionizável, é $6{,}02 \times 10^{23}$.)

(e) Hexoquinase é uma importante enzima no metabolismo da glicose pelas células (ver Capítulo 15). Se a concentração molar da hexoquinase em nossa célula eucariótica é 20μM, quantas moléculas de glicose estarão disponíveis para serem metabolizadas por cada molécula da enzima hexoquinase?

2. Componentes da *E. coli*. As células da *E. coli* têm a forma de um bastão de cerca de 2μm de comprimento e 0,8μm de diâmetro. O volume de um cilindro é dado por $\pi r^2 h$, onde h é a altura do cilindro.

(a) Se a densidade média da *E. coli* (principalmente água) é $1{,}1 \times 10^3$g/L, qual é o peso de uma única célula?

(b) A parede celular protetora da *E. coli* é de 10nm de espessura. Que porcentagem do volume total da bactéria ocupa a parede celular?

(c) A *E. coli* é capaz de crescer e multiplicar-se rapidamente por causa da inclusão em cada célula de cerca de 15.000 ribossomos esféricos (diâmetro 18nm), que realizam a síntese de proteínas. Que porcentagem do volume total celular ocupa os ribossomos?

3. Informação genética no DNA da *E. coli*. A informação genética contida no DNA consiste de uma seqüência linear sucessiva de unidades codificadoras, conhecidas como códons. Cada códon é uma seqüência específica de três nucleotídeos (três pares de nucleotídeos no DNA dupla fita) e cada códon codifica uma unidade de um único aminoácido numa proteína. O peso molecular de uma molécula de DNA da *E. coli* é cerca de $3{,}1 \times 10^9$. O peso molecular médio de um par de nucleotídeos é 660 e cada par de nucleotídeos contribui com 0,34nm do comprimento do DNA.

(a) Calcule o comprimento de uma molécula do DNA da *E. coli*. Compare o comprimento da molécula do DNA com as dimensões da célula (ver Problema 2). Como a molécula de DNA se ajusta na célula?

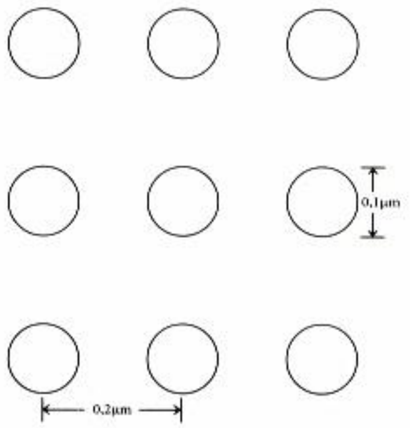
(b) Assuma que a proteína média na *E. coli* consista de uma cadeia de 400 aminoácidos. Qual é o número máximo de proteínas que podem ser codificadas por uma molécula de DNA da *E. coli*?

4. A alta velocidade do metabolismo bacteriano. As células bacterianas possuem uma velocidade de metabolismo muito maior do que as células animais. Em condições ideais algumas bactérias dobrarão de tamanho e se dividirão em 20min, enquanto a maioria das células animais requer 24h sob rápida condições de crescimento. A alta taxa do metabolismo bacteriano requer uma alta razão entre a área da superfície em relação ao volume celular.

(a) Por que a razão superfície/volume tem um efeito na velocidade máxima do metabolismo?

(b) Calcule a razão superfície/volume para a bactéria esférica *Neisseria gonorrhoeae* (diâmetro de 0,5μm), responsável pela doença gonorréia. Compare-a com a razão superfície/volume para uma ameba globular, uma grande célula eucariótica (diâmetro de 150μm). A área da superfície de uma esfera é dada por $4\pi r^2$.

5. Uma estratégia para se aumentar a área da superfície das células. Certas células, cuja função é absorver nutrientes, ou seja, as células que cobrem o intestino delgado ou as células pilosas da raiz de uma planta, estão otimamente adaptadas à sua função, porque a área da sua superfície exposta está aumentada pelas microvilosidades. Considere uma célula epitelial esférica (diâmetro 20μm) cobrindo o intestino delgado. Como apenas uma parte da superfície celular está voltada para o interior do intestino, assuma que um "fragmento" ("patch") correspondendo a 25% da área da célula seja coberto com microvilosidades. Além disso, assuma que as microvilosidades sejam cilindros de 0,1μm de diâmetro, 1,0μm de comprimento e espaçadas numa rede regular de 0,2μm do centro.



Arranjo de microvilosidade sobre o fragmento

(a) Calcule o número de microvilosidades no fragmento.

(b) Calcule a área da superfície do fragmento, assumindo que ele não tenha microvilosidades.

(c) Calcule a área da superfície do fragmento, assumindo que ele tenha microvilosidades.

(d) Que porcentagem de melhoria da capacidade de absorção (refletida pela razão superfície/volume) a presença das microvilosidades oferece?

(e) Quais são as outras organelas e sistemas de órgãos que utilizam essa estratégia para aumentar a capacidade de absorção?

6. Transporte axonal rápido. Alguns neurônios possuem longas e finos processos chamados de axônios os quais são estruturas especializadas para conduzir sinais através de um organismo. Alguns processos axonais podem chegar a 2m, por exemplo, os axônios que se originam na medula espinhal e terminam nos músculos de seus dedos do pé, que chegam a 2m. Pequenas vesículas de membrana, transportando materiais essenciais para a função axonal, movem-se ao longo dos microtúbulos do corpo celular até a extremidade do axônio, pelo "transporte rápido axonal" dependente de cinesina.

(a) Se a velocidade média de uma vesícula é 1μm/s, quanto tempo levará para uma vesícula se movimentar desde o corpo celular da medula espinhal até a ponta axonal nos dedos do pé?

(b) O movimento de grandes moléculas nas células pela difusão é relativamente lento (por exemplo, a hemoglobina difunde-se a uma velocidade de aproximadamente 5μm/s). Entretanto, a difusão da sacarose em uma solução aquosa ocorre a uma velocidade próxima à do mecanismo de transporte rápido (cerca de 4μm/s). Quais são algumas vantagens para a célula ou um organismo do mecanismo de transporte direto, comparado ao que a célula pode realizar somente pela difusão?

(c) Alguns dos estudos que originalmente determinaram a velocidade do movimento vesicular foram realizados sobre microtúbulos *in vitro* (em uma placa). Para isolar os microtúbulos para esses estudos, neurônios intactos foram inicialmente homogeneizados (fragmentados) na presença de 0,2M de sacarose para impedir o inchaço osmótico e o rompimento das organelas intracelulares. Por que isso é uma importante consideração em estudos de fracionamento celular?

CAPÍTULO 3

Biomoléculas

O objetivo da bioquímica é explicar a forma e a função biológica em termos químicos. Uma das formas mais produtivas de se abordar o entendimento dos fenômenos biológicos tem sido aquela de purificar os componentes químicos individuais, tais como uma proteína de um organismo vivo, e caracterizar a sua estrutura química ou sua atividade catalítica. No início do estudo das biomoléculas e de suas interações, algumas questões básicas merecem atenção. Quais espécies de moléculas estão presentes nos organismos vivos e em quais proporções? Quais são as estruturas dessas moléculas e quais forças estabilizam suas estruturas? Quais são suas propriedades químicas e reatividades em isolamento? Como elas interagem umas com as outras? Como e onde as biomoléculas das primeiras células vivas se originaram?

Neste capítulo, faremos uma revisão dos princípios químicos que governam as propriedades das moléculas biológicas: a ligação covalente dos átomos de carbono entre si e com outros elementos, os grupos funcionais que ocorrem nas moléculas biológicas comuns, a estrutura tridimensional e a estereoquímica dos compostos de carbono, e os tipos de reações químicas comuns que ocorrem nos organismos vivos. Em seguida, discutiremos as unidades monoméricas e a contribuição da entropia para as variações de energia livre das reações nas quais essas unidades são polimerizadas para formar as macromoléculas. Finalmente, iremos considerar a origem das unidades monoméricas a partir dos compostos simples presentes na atmosfera terrestre durante os tempos pré-biológicos, isto é, a evolução química ou a evolução pré-biótica.

A composição química da matéria viva, tal como da "água-viva", difere da de seu ambiente físico, o qual é, para esse organismo, a água salgada.

Composição e Ligação Química

No final do século XVIII ficou evidente para os químicos que a composição da matéria viva era claramente diferente da do mundo inanimado. Antoine Lavoisier (1743-1794) notou a relativa simplicidade química do "mundo mineral" e contrastou-a com a complexidade do "mundo dos animais e das plantas"; este último, ele sabia, era composto por substâncias ricas nos elementos carbono, oxigênio, nitrogênio e fósforo.

Dos mais de 90 elementos químicos que ocorrem naturalmente, apenas cerca de 30 são essenciais para os organismos vivos. A maioria dos elementos químicos da matéria viva tem números atômicos relativamente pequenos; apenas cinco deles têm número atômico acima do do selênio, 34 (Fig. 3-1). Os quatro elementos químicos mais abundantes nos organismos, em termos das porcentagens do número total de átomos, são o hidrogênio, o oxigênio, o nitrogênio e o carbono, os quais, juntos, perfazem mais de 99% da massa da maioria das células. Eles são os elementos mais leves capazes de formar uma, duas, três e quatro ligações, respectivamente (Fig. 3-2). Em geral, os elementos mais leves formam as ligações químicas mais fortes. Os elementos químicos que comparecem em quantidades diminutas, microelementos (Fig. 3-1), representam uma fração minúscula do peso do corpo humano, mas são absolutamente essenciais à vida, usualmente porque são essenciais à função de proteínas específicas, incluindo as enzimas. A capacidade transportadora de oxigênio da molécula de hemoglobina, por exemplo, é absolutamente dependente de quatro íons ferro que perfazem somente 0,3% de sua massa.

As biomoléculas são compostos de carbono

A química dos organismos vivos está organizada ao redor do elemento carbono, o qual representa mais da metade do peso seco das células. No metano (CH_4), um átomo de carbono compartilha quatro pares de elétrons com quatro átomos de hidrogênio; cada um dos pares de elétrons compartilhados forma uma ligação simples. O carbono pode também estabelecer ligações simples e duplas com os átomos de oxigênio e com o de nitro-

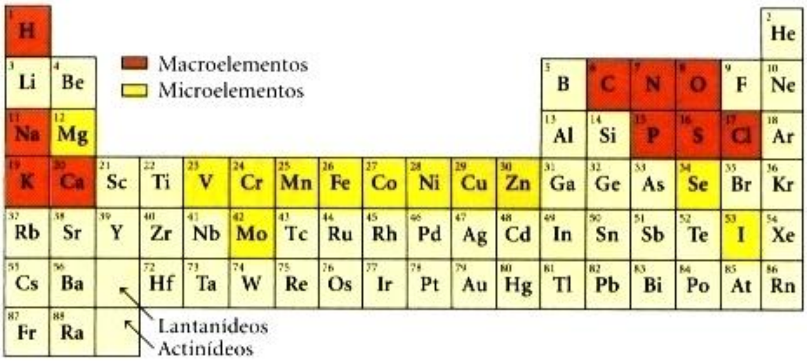

Macroelementos
Microelementos
H He
Li Be B C N O F Ne
Na Mg Al Si P S Cl Ar
K Ca Sc Ti V Cr Mn Fe Co Ni Cu Zn Ga Ge As Se Br Kr
Rb Sr Y Zr Nb Mo Tc Ru Rh Pd Ag Cd In Sn Sb Te I Xe
Cs Ba Hf Ta W Re Os Ir Pt Au Hg Tl Pb Bi Po At Rn
Fr Ra
Lantanídeos
Actinídeos

Figura 3-1 – Elementos essenciais para a vida animal e para a manutenção da saúde. Os macroelementos (sombreados em alaranjado) são componentes estruturais das células e dos tecidos e necessários na dieta em quantidades diárias medidas em gramas. Para os microelementos (sombreados em amarelo), as necessidades são muito menores: para os humanos bastam poucos miligramas por dia, tanto de ferro como de zinco, e ainda menos para muitos outros. As necessidades elementares das plantas e dos microrganismos são muito semelhantes àquelas mostradas aqui.

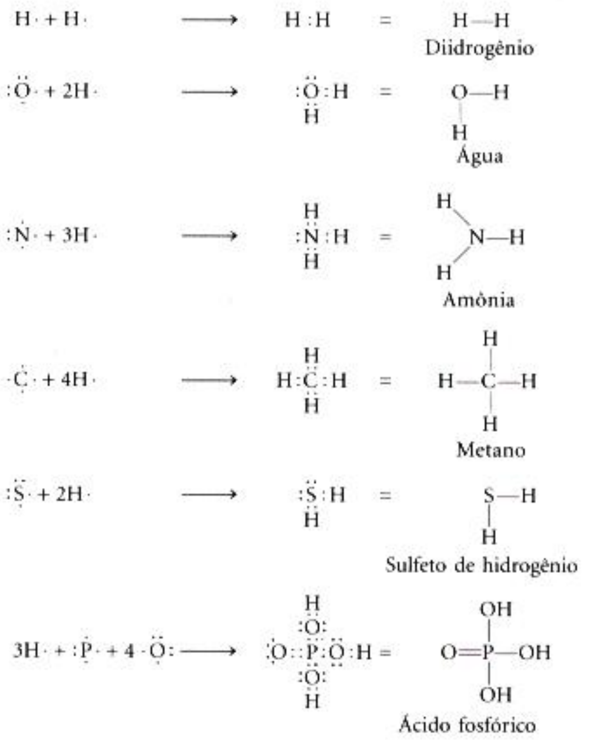


Figura 3-2 – Ligação covalente. Dois átomos com elétrons desemparelhados nas suas camadas externas podem formar ligações covalentes uns com os outros pelo partilhamento de pares de elétrons. Os átomos participantes de ligações covalentes tendem a preencher suas camadas eletrônicas externas.

Átomo	Número de elétrons desemparelhados (em vermelho)	Número de elétrons nas camadas externas completas
H·	1	2
:Ö·	2	8
:N̈·	3	8
·Ċ·	4	8
:S̈·	2	8
:Ṗ·	3	8

gênio (Fig. 3-3). Da maior importância em biologia, é a capacidade de os átomos de carbono compartilharem pares de elétrons entre si para formar ligações simples carbono-carbono, as quais são muito estáveis. Cada átomo de carbono também pode formar ligações simples com um, dois, três ou quatro outros átomos de carbono. Dois átomos de carbono podem também compartilhar dois (ou três) pares de elétrons, formando assim ligações duplas ou triplas carbono-carbono (Fig. 3-3).

As quatro ligações simples que podem ser estabelecidas por um átomo de carbono estão dispostas tetraedricamente, com um ângulo de 109,5° entre duas ligações quaisquer (Fig. 3-4) e um comprimento médio de 0,154nm. Os grupos participantes de cada ligação simples carbono-carbono podem girar livremente ao redor dela; essa liberdade sofre restrições somente quando essas ligações estão ocupadas por grupos muito grandes ou quando são portadoras de cargas elétricas muito altas. Uma dupla ligação carbono-carbono é mais curta (perto de 0,134nm) e mais rígida, e, por isso, permite uma liberdade de rotação muito menor ao longo do seu eixo.

Os átomos de carbono unidos entre si covalentemente podem formar cadeias lineares, cadeias ramificadas e estruturas cíclicas. Outros grupos de átomos, chamados de **grupos funcionais**, são adicionados a esses esqueletos carbônicos, o que confere propriedades químicas específicas à molécula assim formada. As moléculas que contêm esqueletos carbônicos são chamadas de **compostos orgânicos**; eles ocorrem em uma variedade quase ilimitada. A maioria das biomoléculas são compostos orgânicos; portanto, podemos inferir que a versatilidade de ligação do carbono foi um fator maior na seleção dos compostos de carbono para a maquinaria molecular das células durante a origem e a evolução dos organismos vivos. Nenhum outro elemento químico pode formar moléculas com tanta diversidade de formas e de tamanhos ou com tal variedade de grupos funcionais.

Os grupos funcionais determinam as propriedades químicas

A maioria das biomoléculas pode ser vista como derivada dos hidrocarbonetos, os quais são compostos formados por um esqueleto de átomos de carbono ligados covalentemente entre si e aos quais estão ligados apenas átomos de hidrogênio. Os esqueletos carbônicos desses compostos são muito estáveis. Os átomos de hidrogênio podem ser substituídos individualmente por uma grande variedade de grupos funcionais para formar famílias diferentes de compostos orgânicos. Famílias típicas de compostos orgânicos são: os álcoois, os quais possuem um ou mais grupos hidroxila; as aminas, possuidoras do grupo funcional amino; os aldeídos e as cetonas, os quais possuem o grupo carbonila; e os ácidos carboxílicos, que exibem os grupos carboxilas (Fig. 3-5).

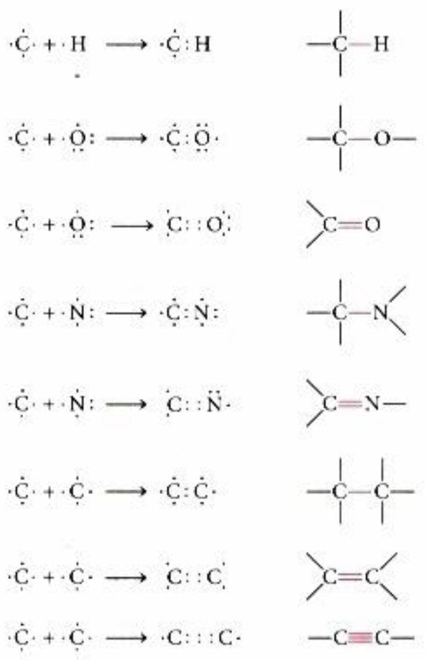


Figura 3-3 – Observe a versatilidade do átomo de carbono em formar ligações covalentes simples, duplas e triplas (estas em vermelho), particularmente consigo mesmo. As ligações triplas raramente ocorrem em biomoléculas.

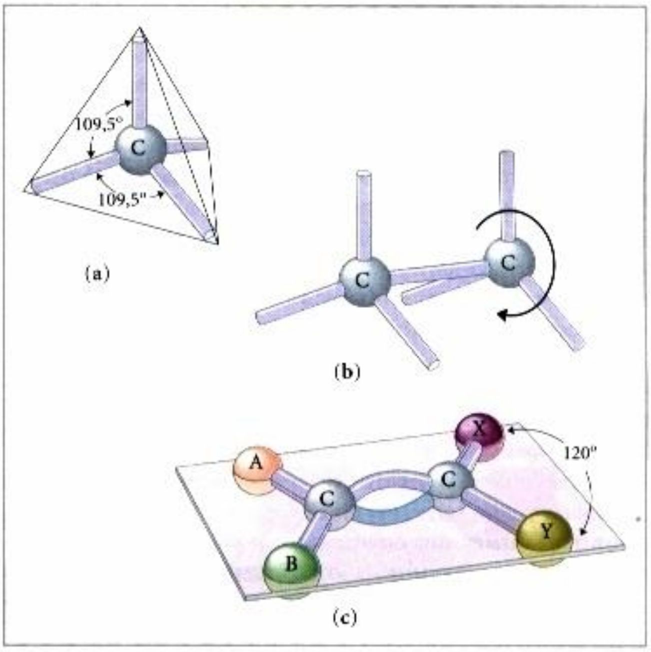

109,5°
C
109,5°
(a)
C
C
(b)
X
A
C
C
120°
Y
B
(c)

Figura 3-4 – Geometria da ligação do carbono. (**a**) Os átomos de carbono têm um arranjo tetraédrico característico de suas quatro valências, estas têm 0,154nm de comprimento e um ângulo de 109,5° entre uma e outra. (**b**) Ligações simples carbono-carbono têm liberdade de rotação ao redor de seu eixo e isso é mostrado, na figura, para o composto etano (CH_3—CH_3). (**c**) Ligações duplas carbono-carbono são mais curtas e não permitem livre rotação dos grupos ligados por elas. As ligações simples, pertencentes a cada um dos átomos de carbono unidos por ligação dupla, fazem um ângulo de 120° entre si. Os dois átomos de carbono unidos por ligação dupla e os átomos designados por A, B, X e Y estão todos em um mesmo plano rígido.

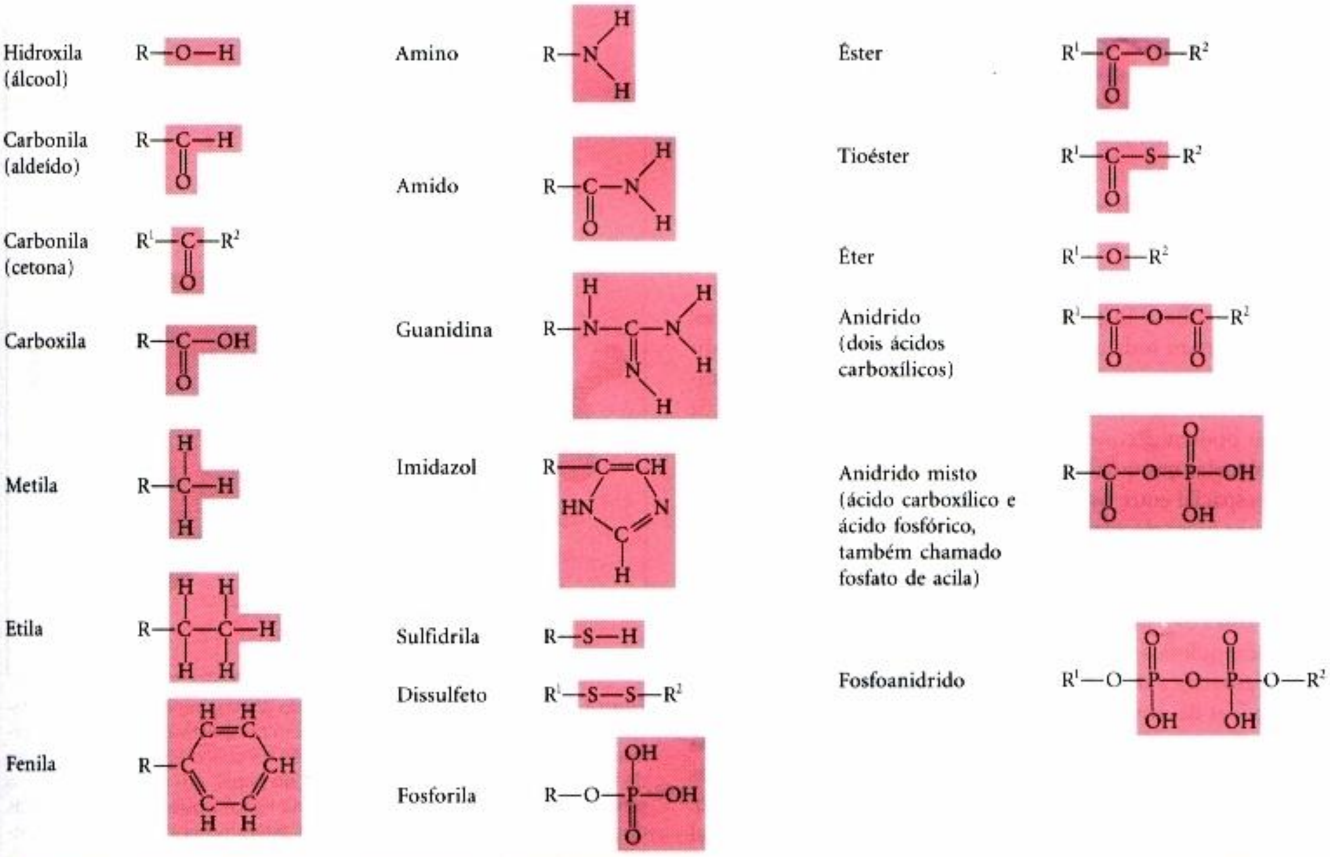

Hidroxila (álcool)
Carbonila (aldeído)
Carbonila (cetona)
Carboxila
Metila
Etila
Fenila
Amino
Amido
Guanidina
Imidazol
Sulfidrila
Dissulfeto
Fosforila
Éster
Tioéster
Éter
Anidrido (dois ácidos carboxílicos)
Anidrido misto (ácido carboxílico e ácido fosfórico, também chamado fosfato de acila)
Fosfoanidrido

Figura 3-5 – Alguns dos grupos funcionais comuns de biomoléculas. Todos os grupos são mostrados em sua forma neutra (não-ionizada). Nesta figura e em toda parte do livro, usamos R para representar "qualquer substituinte". Pode ser um simples átomo de H, mas tipicamente ele é uma porção que contém carbono. Quando dois ou mais substituintes são mostrados em uma molécula, designamo-los R^1, R^2, e assim por diante.

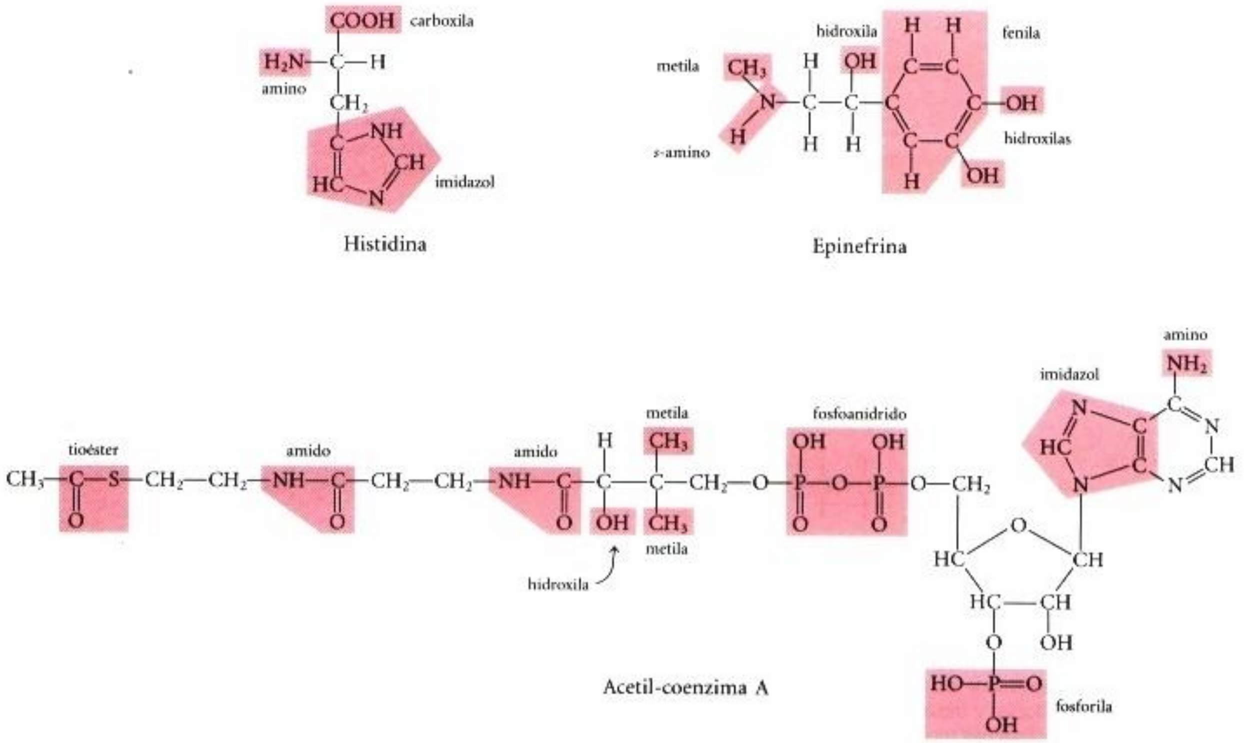


Figura 3-6 – Grupos funcionais comuns nas biomoléculas. Histidina é um dos aminoácidos encontrados em proteínas; epinefrina é um hormônio; acetil-coenzima A é um transportador de grupos acetil em algumas reações enzimáticas. Note que o grupo amino na epinefrina é um grupo amino secundário (s) com um de seus hidrogênios amínicos substituído por outro grupo.

Muitas biomoléculas são polifuncionais, contendo dois ou mais grupos funcionais diferentes (Fig. 3-6), cada um com suas reações químicas características. A "personalidade" química de um composto como epinefrina ou acetil-coenzima A é determinada pela química de seus grupos funcionais e a disposição destes no espaço tridimensional.

Estrutura Tridimensional: Configuração e Conformação

Embora as ligações covalentes e os grupos funcionais das biomoléculas tenham importância central para a função destas, eles não contam toda a história; o arranjo espacial em três dimensões dos átomos de uma biomolécula — sua estereoquímica — é também crucialmente importante. Os compostos de carbono podem, freqüentemente, existir como **estereoisômeros**, moléculas nas quais a ordem das ligações é a mesma, mas a relação espacial entre os átomos é diferente. Interações moleculares entre biomoléculas são invariavelmente estereoespecífica; isto é, elas requerem estereoquímica específica nas moléculas interativas.

A Figura 3-7 mostra três maneiras de ilustrar a configuração estereoquímica das moléculas simples. O diagrama em perspectiva especifica de forma não-ambígua a configuração (estereoquímica) de um composto. O modelo bola-e-bastão representa melhor os ângulos entre as ligações e o comprimento da ligação centro a centro, enquanto os contornos das moléculas são mais bem representados pelos modelos do tipo espaço-cheio. Nestes últimos modelos, o raio de cada átomo é proporcional ao seu raio de van der Waals (Tabela 3-1) e os contornos da molécula representam os limites externos da região da qual são excluídos outros átomos e moléculas.

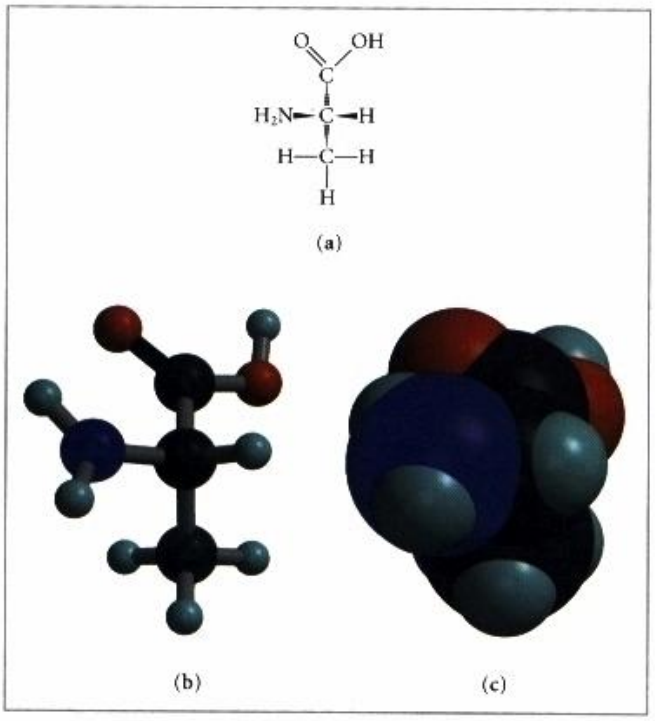


Figura 3-7 – A estrutura do aminoácido alanina representada por diferentes modelos. (**a**) Fórmula estrutural em perspectiva. O símbolo na forma de cunha (➡) representa uma ligação na qual o átomo na extremidade de larga projeta-se para fora do plano do papel, em direção ao leitor; o símbolo pontilhado (⇢) representa uma ligação que se dirige para trás do plano do papel. (**b**) Modelo bola-e-bastão mostrando os comprimentos relativos das ligações e os ângulos formados entre elas. As bolas indicam o tamanho aproximado dos núcleos atômicos. (**c**) Modelo do tipo espaço-cheio, no qual cada átomo é mostrado com o seu raio de van der Waals correto (veja a Tabela 3-1).

Tabela 3-1 – Raio de van der Waals e raio da ligação covalente (ligação simples) de alguns elementos*

Elemento	Raio de van der Waals (nm)	Raio covalente para a ligação simples (nm)
H	0,1	0,030
O	0,14	0,074
N	0,15	0,073
C	0,17	0,077
S	0,18	0,103
P	0,19	0,110
I	0,22	0,133

* Para cada elemento, o raio de van der Waals é cerca de duas vezes maior que o raio covalente. Em uma interação de van der Waals ou em uma ligação covalente, a distância entre os núcleos é aproximadamente igual à soma desses valores para os dois átomos. Assim, o comprimento de uma ligação simples carbono-carbono é cerca de 0,077 + 0,077 = 0,154nm.

A configuração de uma molécula é mudada somente pela quebra de uma ligação

Configuração é o arranjo espacial de uma molécula orgânica, que lhe é conferido ou (1) pela presença de duplas ligações, ao redor das quais não existe liberdade de rotação, ou então (2) por centros quirais, ao redor dos quais os grupos substituintes estão arranjados em uma seqüência específica. A característica identificadora dos isômeros configuracionais é que eles podem ser convertidos um no outro sem a quebra de uma ou mais ligações covalentes.

A Figura 3-8a mostra a configuração do ácido maléico e de seu isômero, o ácido fumárico. Esses compostos são **isômeros geométricos** ou **isômeros cis-trans**; eles diferem no arranjo de seus grupos substituintes com respeito à dupla ligação, a qual é incapaz de girar. O ácido maléico é o isômero cis, e o ácido fumárico é o isômero trans; cada um deles é um composto bem definido e pode ser isolado, tendo propriedades químicas únicas — um sítio de ligação (por exemplo, em uma enzima) que é complementar a uma dessas moléculas não seria apropriado para a outra, o que explica o porquê desses compostos terem papéis biológicos distintos, apesar de sua semelhança química.

Quatro substituintes diferentes ligados a um átomo de carbono tetraédrico podem estar arranjados espacialmente em duas formas diferentes (isto é, ter duas configurações; Fig. 3-9), produzindo dois estereoisômeros com propriedades químicas idênticas ou similares, porém diferindo em certas propriedades físicas e biológicas. Um átomo de carbono com quatro substituintes diferentes é dito assimétrico, e carbonos assimétricos são chamados **centros quirais** (do grego *chiros*, "mão", alguns estereoisômeros estão relacionados estruturalmente como a mão direita está para a esquerda). Uma molécula com um carbono quiral pode ter apenas dois estereoisômeros, mas quando dois ou mais (n) carbonos quirais estão presentes, podem existir 2^n estereoisômeros. Alguns estereoisômeros são imagens especulares um do outro e são chamados de **enantiômeros** (Fig. 3-9). Pares de estereoisômeros que não são imagens especulares um do outro são chamados de **diastereômeros** (Fig. 3-10).

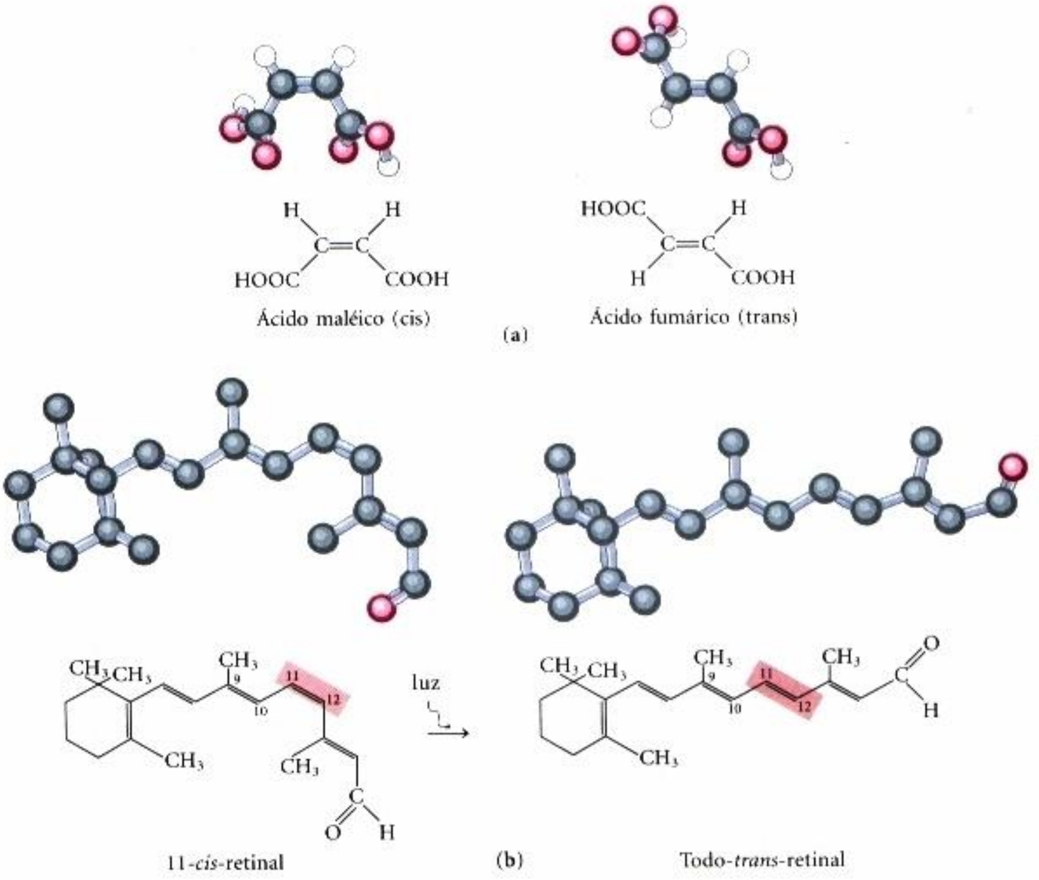


Figura 3-8 – Configurações de isômeros geométricos. (**a**) Os isômeros como o ácido maléico e o ácido fumárico não podem ser interconvertidos sem a quebra de ligações covalentes, o que requer o fornecimento de uma grande quantidade de energia. (**b**) Na retina de vertebrados, o evento inicial na detecção da luz é a absorção da radiação visível pelo 11-*cis*-retinal comum. A energia da luz absorvida (cerca de 250kJ/mol) converte o 11-*cis*-retinal em todo-*trans*-retinal, desencadeando mudanças elétricas na célula da retina que levam à formação do impulso nervoso.

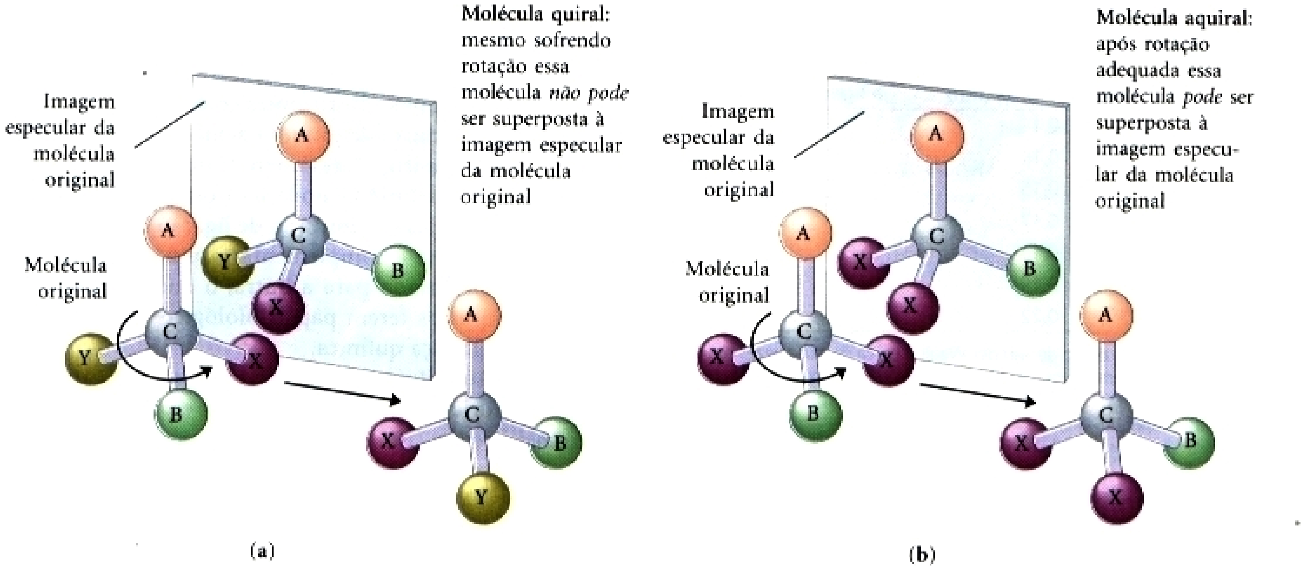


Imagem especular da molécula original
Molécula quiral: mesmo sofrendo rotação essa molécula *não pode* ser superposta à imagem especular da molécula original
Molécula original
A
C
Y
X
B
(a)
Imagem especular da molécula original
Molécula aquiral: após rotação adequada essa molécula *pode* ser superposta à imagem especular da molécula original
Molécula original
(b)

Figura 3-9 – **Assimetria molecular: moléculas quirais e aquirais**. (**a**) Quando um átomo de carbono tem quatro grupos substituintes diferentes (A, B, X, Y), eles podem ser arranjados de duas formas que representam imagens especulares não-superponíveis (enantiômeros). Um tal átomo de carbono é assimétrico e chamado átomo quiral ou centro quiral. (**b**) Quando há apenas três grupos químicos diferentes ligados a um mesmo átomo de carbono (isto é, um mesmo grupo ocorre duas vezes), apenas uma configuração espacial é possível e a molécula é simétrica, ou aquiral. Neste caso, a molécula é superponível à sua imagem especular: a molécula à esquerda pode ser girada em direção anti-horária (ao redor do eixo definido pela ligação A—C e no sentido de A para C) para criar a molécula em espelho.

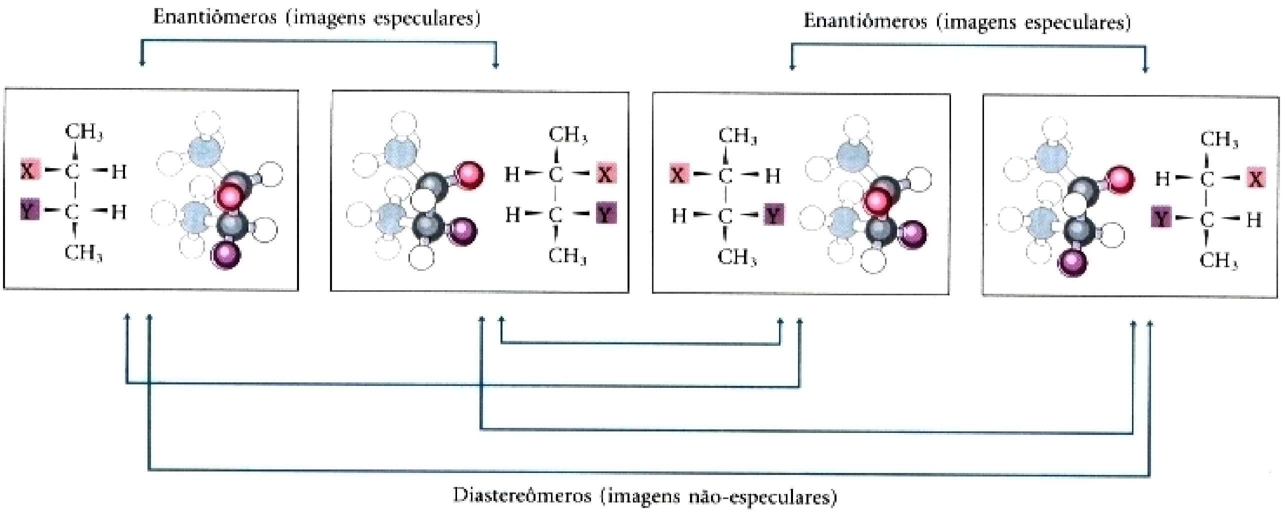

Enantiômeros (imagens especulares)
Enantiômeros (imagens especulares)
CH₃
X — C — H
Y — C — H
CH₃
CH₃
H — C — X
H — C — Y
CH₃
CH₃
X — C — H
H — C — Y
CH₃
CH₃
H — C — X
Y — C — H
CH₃
Diastereômeros (imagens não-especulares)

Figura 3-10 – **Dois tipos de estereoisômeros**. Existem quatro butanos diferentes 2,3 dissubstituídos (n = 2 carbonos assimétricos, e por isso 2^n = 4 estereoisômeros). Cada um é mostrado em um boxe, com a fórmula estrutural em perspectiva e com o modelo bola-e-bastão, que sofreu rotação para permitir ao leitor ver todos os grupos. Alguns pares de estereoisômeros são imagens especulares um do outro, portanto enantiômeros. Outros pares não são imagens em espelho, estes são diastereômeros. (Adaptado de Carrol F. (1998) *Perspectives on Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, p. 63, Brooks/Cole Publishing Co., Pacific Grove, CA.)

Como Louis Pasteur observou (Adendo 3-1), enantiômeros têm propriedades químicas idênticas, porém diferem em uma propriedade física característica, sua interação com a luz plano-polarizada. Em soluções separadas, dois enantiômeros giram o plano da luz plano-polarizada em direções opostas, mas soluções equimolares de dois enantiômeros (**misturas racêmicas**, na terminologia de Pasteur) não mostram rotação óptica. Compostos sem centros quirais não giram o plano da luz plano-polarizada.

Interações biológicas (entre enzima e substrato, receptor e hormônio, ou anticorpo e antígeno, por exemplo) são estereoespecíficas: o "encaixe" nessas interações necessita ser estereoquimicamente correto. A estrutura de uma biomolécula precisa ser chamada e representada de forma clara para que sua estereoquímica não seja ambígua. Para compostos com mais de um centro quiral, o sistema RS de nomenclatura é freqüentemente mais útil que o sistema D e L descritos no Capítulo 5. No sistema RS, cada grupo ligado ao carbono quiral recebe *uma prioridade*. As prioridades de alguns substituintes comuns são

$$—OCH_2 > —OH > —NH_2 > —COOH > —CHO > —CH_2OH > —CH_3 > —H$$

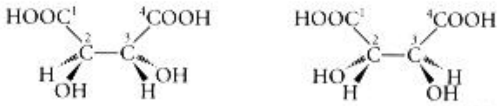
Adendo 3-1 Louis Pasteur e a atividade óptica: *in vino, veritas*

Louis Pasteur
(1822-1895)

Louis Pasteur, em 1843, foi o primeiro a oferecer uma explicação correta para o fenômeno chamado de **atividade óptica**, durante suas investigações do material cristalino que se acumulava nos barris de vinho ("ácido paratartárico", também chamado de ácido racêmico, da palavra latina *racemus*, isto é, "cacho de uvas"). Ele usou uma pinça muito fina para separar dois tipos de cristais de forma semelhante, porém imagens especulares um do outro. Ambos provaram ter todas as características químicas do ácido tartárico, porém um deles girava a luz plano-polarizada para a esquerda (levorrotatório) e o outro para a direita (dextrorrotatório). Depois, Pasteur descreveu o experimento e sua interpretação:

> "Nos corpos isoméricos, os elementos e as proporções nos quais eles estão combinados são os mesmos, apenas o arranjo dos átomos é diferente... Nós sabemos, por um lado, que o arranjo molecular dos dois ácidos tartáricos é assimétrico e, por outro lado, que esses arranjos são absolutamente idênticos, à exceção de que eles exibem a assimetria em direções opostas. Estarão os átomos do dextro-ácido agrupados na forma de uma espiral orientada à direita, ou então colocados no ápice de um tetraedro irregular, ou então dispostos de acordo com tal ou qual arranjo assimétrico? Nós não o sabemos".*

Hoje, nós o sabemos. Estudos de cristalografia de raios X, em 1951, confirmaram que as formas levo e dextrorrotatórias do ácido tartárico são imagens especulares uma da outra e estabeleceram a configuração absoluta de cada uma delas (Fig. 1). A mesma abordagem foi usada para demonstrar que o aminoácido alanina tem duas formas estereoisoméricas (designadas D e L), no entanto a alanina nas proteínas existe exclusivamente em uma forma (o isômero L, veja Capítulo 5).



(2*R*,3*R*)-ácido tartárico
(dextrorrotatório)

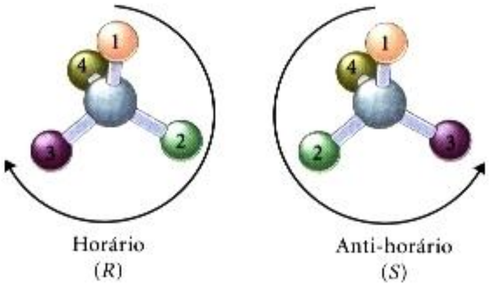
(2*S*,3*S*)-ácido tartárico
(levorrotatório)

Figura 1 – Pasteur separou os cristais dos dois estereoisômeros do ácido tartárico e mostrou que soluções das formas separadas giravam a luz plano-polarizada na mesma extensão, porém em direções opostas. As formas dextro e levorrotatórias de Pasteur foram depois demonstradas como sendo os isômeros (*R,R*) e (*S,S*) mostrados aqui. O sistema RS de nomenclatura é descrito no texto.

---

* Extraído da conferência de Pasteur na Société Chimique de Paris em 1883, citado em DuBos R. (1976) *Louis Pasteur: Free Lance of Science*, p. 95, Charles Scribner's Sons, New York.

O átomo de carbono quiral é observado com o grupo de menor prioridade (4) apontado para longe do observador. Se a prioridade dos outros três grupos (1 a 3) diminui em direção horária, a configuração é *R* (do latim *rectus*, "direita"), se em direção anti-horária, a configuração é *S* (do latim *sinister*, "esquerda").



Dessa forma, cada carbono quiral é designado ou como *R* ou como *S*, e a inclusão dessas designações no nome do composto fornece uma descrição sem ambigüidades da estereoquímica em cada centro quiral.

A conformação molecular é alterada pela rotação ao redor das ligações simples

O termo **conformação** molecular refere-se ao arranjo espacial dos grupos substituintes que são livres para assumir diferentes posições no espaço, sem a quebra de qualquer ligação, devido à liberdade de rotação da ligação. Por exemplo, no etano, um hidrocarboneto simples, existe uma liberdade de rotação quase completa ao redor da ligação simples carbono-carbono. Muitas conformações moleculares do etano, diferentes e interconvertíveis, são possíveis, dependendo do grau de rotação (Fig. 3-11).

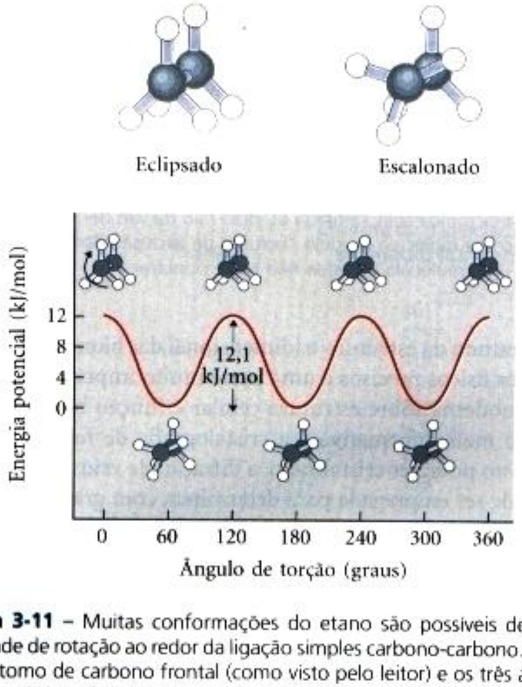


Figura 3-11 – Muitas conformações do etano são possíveis devido à liberdade de rotação ao redor da ligação simples carbono-carbono. Quando o átomo de carbono frontal (como visto pelo leitor) e os três átomos de hidrogênio a ele ligados giram em relação ao átomo de carbono situado atrás, a energia potencial da molécula aumenta até um máximo alcançado na conformação totalmente eclipsada (ângulos de torção 0°, 120° etc.) e, então, cai na conformação toda escalonada (ângulos de torção 60°, 180° etc.). As diferenças de energia são suficientemente pequenas para permitirem uma rápida interconversão das duas formas (milhões de vezes por segundo). Assim, as formas eclipsada e escalonada não podem ser isoladas uma da outra.

Duas dessas conformações são de interesse especial: a conformação escalonada que é muito mais estável que todas as outras e portanto predomina, e a forma eclipsada, que é a menos estável. Não é possível isolar nenhuma dessas formas conformacionais, porque elas são interconvertíveis e estão em equilíbrio uma com a outra. Entretanto, quando um ou mais átomos de hidrogênio em cada átomo de carbono é substituído por um grupo funcional que é muito grande ou eletricamente carregado, a liberdade de rotação ao redor da ligação simples carbono-carbono é diminuída. Isso limita o número de conformações estáveis dos derivados do etano.

Configuração e conformação definem estruturas de biomoléculas

A estrutura tridimensional de biomoléculas grandes e pequenas — a combinação entre configuração e conformação — é de extrema importância em suas interações biológicas. Por exemplo, na ligação de um substrato (reagente) ao sítio catalítico de uma enzima, as duas moléculas precisam ser estruturalmente complementares, para que a catálise ocorra com eficiência. Essa complementaridade também é requerida na ligação de uma molécula de hormônio ao seu receptor presente na membrana da célula e na interação entre uma molécula de antígeno com uma molécula de anticorpo específico (Fig. 3-12).

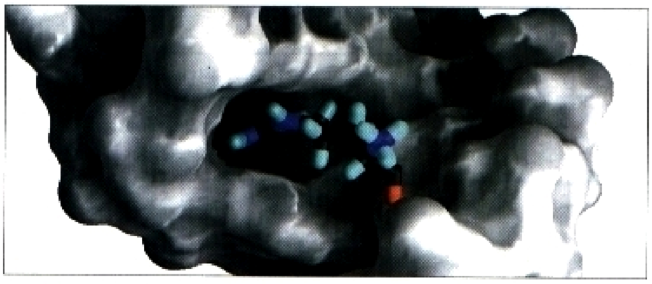


Figura 3-12 – **Ajuste complementar de uma macromolécula e de uma pequena molécula**. Um segmento de RNA da região regulatória TAR do genoma do HIV (cinza) e a argininamida (colorido), um resíduo de uma proteína que se liga nessa região, aqui são mostrados. A argininamida ajusta-se dentro de uma fenda na superfície do RNA e é mantida nessa orientação por várias interações não-covalentes com o RNA. Essa representação da molécula de RNA é produzida com o programa de computador GRASP©, que pode calcular a forma exterior de uma superfície de uma macromolécula, definida ou pelo raio de van der Waals de todos os átomos na molécula ou pelo "volume de exclusão do solvente" além do qual uma molécula de água não pode penetrar.

O estudo da estrutura tridimensional das biomoléculas com métodos físicos precisos é uma parte muito importante na pesquisa moderna sobre estrutura celular e função bioquímica. O método mais informativo é a cristalografia de raios X. Se um composto pode ser cristalizado, a difração de raios X pelos cristais pode ser empregada para determinar, com grande precisão, a posição de cada átomo em relação a cada um de todos os outros átomos. A estrutura da maioria das biomoléculas pequenas (aquelas com menos de 50 átomos), e muitas das moléculas maiores, como as proteínas, tem sido deduzida por esse meio.

A cristalografia de raios X fornece uma figura estática da molécula dentro dos limites do cristal. Entretanto, as biomoléculas quase nunca existem como cristais dentro da célula; elas estão dissolvidas no citosol ou associadas a algum outro componente da célula. Quando em solução, as moléculas têm mais liberdade de movimento intramolecular em comparação a quando em um cristal. Em moléculas grandes, como as proteínas, as pequenas variações permitidas às suas unidades monoméricas, de acordo com a estrutura tridimensional, adicionam-se de forma a conferir à molécula uma extrema flexibilidade. Várias técnicas, como a espectroscopia por ressonância nuclear magnética (RNM), complementam a cristalografia com raios X fornecendo informação a respeito da estrutura da biomolécula, quando em solução. O avanço da tecnologia, com a produção de campos magnéticos muito fortes, ampliou o uso da espectroscopia da RNM na determinação de estruturas de moléculas maiores, incluindo proteínas (Fig. 3-13). As técnicas de cristalografia de raios X e espectroscopia da RNM estão descritas adiante, no Adendo 6-3.

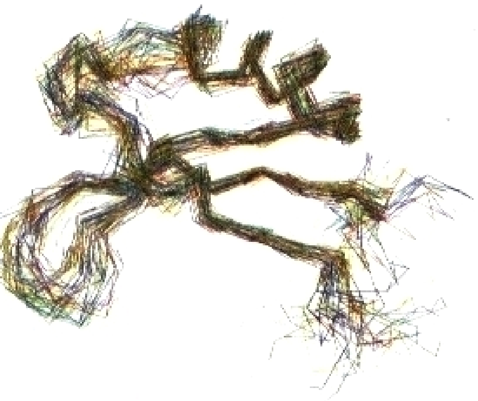
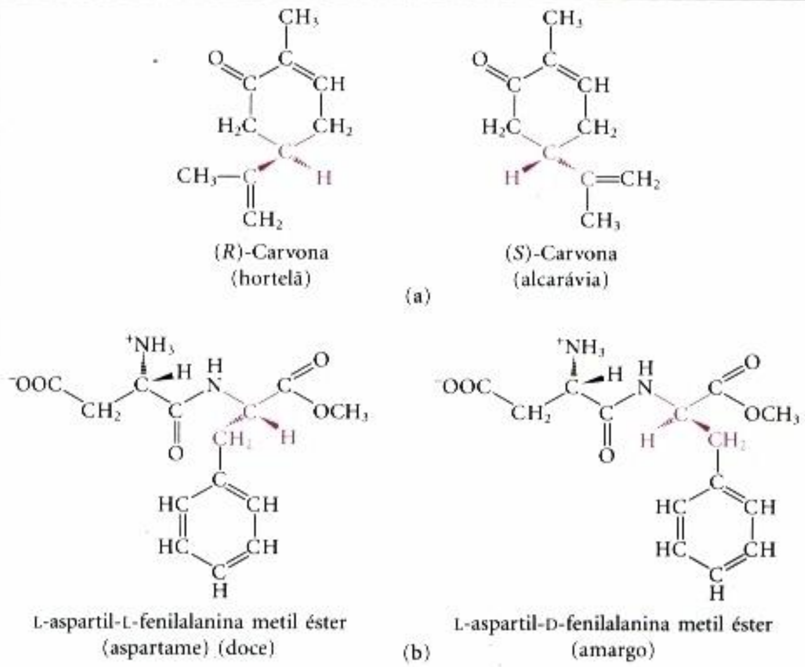


Figura 3-13 – Estrutura da proteína *"brazzein"* determinada por espectroscopia de RNM. *"Brazzein"*, isolada do fruto da *Pentadiplandra*, uma planta do oeste da África, é 2.000 vezes mais doce que a sacarose (grama a grama). Nesta representação, somente a parte mais importante da estrutura da proteína é mostrada sem as cadeias individuais laterais de aminoácidos. Espectroscopia de RNM mostra que em solução a proteína pode assumir acima de 43 conformações muito semelhantes, sendo aqui cada uma mostrada em cores diferentes. Essa espécie de variabilidade conformacional não é vista por cristalografia de raios X, que requer que a proteína esteja congelada em uma conformação e em sua forma cristalina.

Interações entre biomoléculas são estereoespecíficas

As moléculas quirais nos organismos vivos estão geralmente presentes em apenas uma de suas formas quirais. Por exemplo, os aminoácidos que ocorrem nas proteínas o fazem apenas como os isômeros L. A glicose, a subunidade monomérica do amido, tem cinco carbonos assimétricos, porém biologicamente ocorre em apenas uma de suas formas quirais: o isômero D (as convenções para denominar os estereoisômeros dos aminoácidos estão descritas no Capítulo 5, e aquelas para os açúcares, no Capítulo 9). Quando um composto que tem um átomo de carbono assimétrico é sintetizado quimicamente no laboratório, as reações não-biológicas geralmente produzem todas as formas quirais possíveis, resultando em uma mistura equimolar que não gira a luz plano-polarizada (uma **mistura racêmica**). As formas quirais em tal mistura somente podem ser separadas por métodos físicos muito trabalhosos. Os compostos quirais nas células vivas são produzidos em apenas uma forma quiral, porque as enzimas que os sintetizam são também moléculas quirais.

Estereoespecificidade, a habilidade para distinguir entre estereoisômeros, é uma propriedade comum das enzimas e de outras proteínas, e uma característica peculiar da lógica molecular das células vivas. Se o sítio de ligação de uma proteína é complementar a um isômero de um composto quiral, ele não será complementar a outro isômero, pela mesma razão que uma luva da mão esquerda não se ajusta à mão direita. Dois exemplos da capacidade de os sistemas biológicos distinguirem entre os dois estereoisômeros são mostrados na figura 3-14. Receptores sensoriais específicos (para odor e para sabor) facilmente distinguem os membros de cada par de diastereômeros.



(*R*)-Carvona
(hortelã)

(*S*)-Carvona
(alcarávia)

(a)

L-aspartil-L-fenilalanina metil éster
(aspartame) (doce)

(b)

L-aspartil-D-fenilalanina metil éster
(amargo)

Figura 3-14 – Os estereoisômeros podem ser distinguidos por receptores sensoriais humanos do odor e do sabor. (**a**) Os dois estereoisômeros da carvona, designados *R* e *S*. A (*R*)-carvona obtida do óleo de hortelã tem fragrância característica de hortelã e a (*S*)-carvona obtida do óleo de semente de alcarávia cheira como a alcarávia. (**b**) O adoçante artificial aspartame é vendido comercialmente e facilmente distinguível pelo sabor de seu estereoisômero que tem sabor amargo, embora os dois difiram apenas na configuração ao redor de um dos dois átomos de carbono quirais.

Reatividade Química

Os mecanismos das reações bioquímicas, fundamentalmente, não são diferentes dos de outras reações químicas. Eles podem ser entendidos e previstos a partir da natureza dos grupos funcionais dos reagentes. Os grupos funcionais alteram a distribuição eletrônica e a geometria dos átomos vizinhos e dessa maneira afetam a reatividade química de toda a molécula. Embora um grande número de reações químicas diferentes ocorra em uma célula típica, essas reações são de apenas alguns tipos gerais. Brevemente serão revistos os aspectos fundamentais sobre ligação química e reatividade, e então resumidos os cinco tipos de reações mais comumente encontrados em bioquímica. As reações específicas serão consideradas em maiores detalhes posteriormente.

A força da ligação está relacionada às propriedades dos átomos que dela participam

Nas reações químicas, ligações são quebradas e novas são formadas. A força de uma ligação química depende de eletronegatividades relativas — as afinidades relativas por elétrons — dos elementos ligados (Tabela 3-2), da distância dos elétrons que participam da ligação em relação a cada um dos núcleos e da carga nuclear de cada átomo. O número de elétrons compartilhados também influencia a força da ligação; ligações duplas são mais fortes que ligações simples, e ligações triplas são ainda mais fortes (Tabela 3-3). A força de uma ligação química é expressa em joules, e conhecida como energia de ligação (em bioquímica, as calorias têm sido as unidades de energia mais freqüentemente empregadas, como por exemplo para expressar a força de ligação e a energia livre; o joule é a unidade de energia no Sistema Internacional de Unidades e será usado ao longo deste livro; para conversões, 1cal é igual a 4,184J). A energia de ligação pode ser imaginada quer como a quantidade de energia necessária para romper uma ligação quer como a quantidade de energia ganha pelo ambiente, quando os dois átomos formam essa ligação. Um meio de se introduzir energia em um sistema é aquecê-lo, o que dá às moléculas maior energia cinética; a temperatura é uma medida da energia cinética média de uma população de molé-

Tabela 3-2 – A eletronegatividade de alguns elementos químicos

Elemento	Eletronegatividade*	Elemento	Eletronegatividade*
F	4,0	Fe	1,8
O	3,5	Co	1,8
Cl	3,0	Ni	1,8
N	3,0	Mo	1,8
Br	2,8	Zn	1,6
S	2,5	Mn	1,5
C	2,5	Mg	1,2
I	2,5	Ca	1,0
Se	2,4	Li	1,0
P	2,1	Na	0,9
H	2,1	K	0,8
Cu	1,9		

* Quanto maior este número, tanto mais eletronegativo é o elemento.

Tabela 3-3 – Energia de dissociação (resistência) das ligações mais freqüentes nas biomoléculas

Tipo de ligação	Energia de dissociação da ligação (kJ/mol)
Ligações simples	
O—H	461*
H—H	435*
P—O	419*
C—H	414*
N—H	389*
C—O	352*
C—C	348*
S—H	339*
C—N	293*
C—S	260*
N—O	222*
S—S	214*
Ligações duplas	
C═O	712
C═N	615
C═C	611
P═O	502
Ligações triplas	
C≡C	816
N≡N	930

* Quanto maior a energia requerida para a dissociação da ligação (quebra), mais forte é essa ligação.

culas. Quando o movimento molecular é suficientemente violento, as vibrações intramoleculares e as colisões intermoleculares podem, em algumas ocasiões, quebrar as ligações químicas. O aquecimento aumenta a fração de moléculas com energia suficientemente alta para reagir. Quando o movimento molecular é suficientemente violento, vibrações intramoleculares e colisões intermoleculares, algumas vezes, quebram ligações e permitem a formação de novas.

Quando nas reações químicas as ligações são quebradas e novas ligações são formadas, a diferença entre a energia do ambiente usada para romper as ligações e a energia ganha pelo ambiente na formação de novas ligações é virtualmente idêntica à **variação da entalpia** para a reação, **ΔH** (a diferença de energia torna-se exatamente igual à variação da entalpia depois de uma pequena correção para a pequena variação do volume em sistemas com pressão constante). Se o sistema absorve energia na forma de calor à medida que a transformação ocorre (isto é, se a reação é **endotérmica**), então ΔH tem, por definição, um valor positivo; quando o calor é produzido, como nas reações **exotérmicas**, ΔH é negativo. De forma sucinta, a variação na entalpia para uma reação covalente reflete os tipos e o número dessas ligações que são sintetizadas e quebradas. Como veremos depois neste capítulo, a variação na entalpia é um dos três fatores que determinam a variação na energia livre para a reação; os outros dois são a temperatura e a mudança na entropia.

Nas células ocorrem cinco tipos gerais de transformações químicas

A maioria das células tem a capacidade de realizar milhares de reações específicas e enzimaticamente catalisadas como, por exemplo, a transformação de nutrientes simples, como a glicose em aminoácidos, nucleotídeos ou lipídios; a extração de energia dos alimentos por oxidação ou a polimerização de subunidades em macromoléculas. Felizmente para o estudante de bioquímica existe um padrão nessa multidão de reações. Nós não precisamos aprender todas essas reações para compreender a lógica molecular da vida.

A maioria das reações nas células vivas pertence a um dos cinco tipos (ou categorias) gerais: (1) oxidação-redução; (2) reações que formam ou quebram ligações carbono-carbono; (3) reações que rearranjam a estrutura das ligações ao redor de um ou mais átomos de carbono; (4) transferência de grupos funcionais; (5) reações nas quais duas moléculas se condensam com a eliminação de uma molécula de água. As reações em uma mesma categoria geral ocorrem por meio de mecanismos similares.

Todas as reações de oxidação-redução envolvem transferência de elétrons

Quando os dois átomos que compartilham elétrons em uma ligação covalente têm afinidade igual para os elétrons, como no caso de dois átomos de carbono, a ligação resultante é não-polar. Quando dois elementos que diferem em afinidade por elétrons, ou eletronegatividade (Tabela 3-2), formam uma ligação covalente (por exemplo, C e O), a ligação é polarizada; os elétrons compartilhados provavelmente estarão na região do átomo mais eletronegativo (O) e não naquela do átomo menos eletronegativo (C). No caso extremo de dois átomos de eletronegatividade muito diferente (Na e Cl, por exemplo), um dos átomos cede os elétrons para o outro átomo, resultando na formação de íons e interações iônicas, como aquelas existentes no cloreto de sódio (NaCl) sólido.

Nas ligações carbono-hidrogênio, o carbono mais eletronegativo possui os dois elétrons compartilhados com H, mas, nas ligações carbono-oxigênio, os dois elétrons estão deslocados unicamente em favor do oxigênio. Então, na transformação de —CH_3 (um alcano) para —CH_2OH (um álcool), o átomo de carbono perde efetivamente elétrons — o que é, por definição, oxidação. A Figura 3-15 mostra que átomos de carbono encontrados em bioquímica podem existir em cinco estados de oxidação, dependendo dos elementos com os quais o carbono compartilha elétrons.

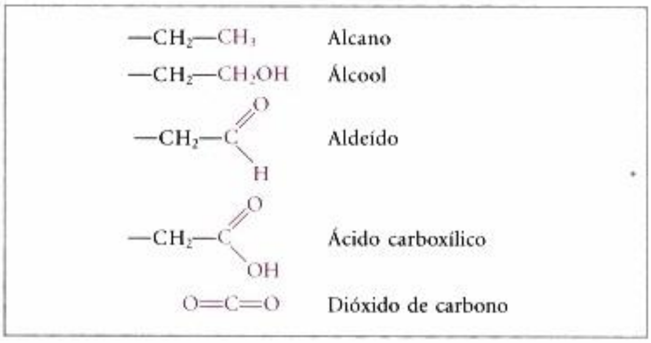


Figura 3-15 – Estados de oxidação do carbono em biomoléculas. Cada composto é formado pela oxidação de carbono (em vermelho) nos compostos listados acima. Dióxido de carbono é a forma mais oxidada do carbono encontrada nos sistemas vivos.

Em muitas oxidações biológicas, um composto perde dois elétrons e dois íons de hidrogênio (isto é, dois átomos de hidrogênio); essas reações são comumente chamadas de **desidrogenações** e as enzimas que as catalisam são chamadas de **desidrogenases** (Fig. 3-16). Em algumas, mas não em todas as oxidações biológicas, um átomo de carbono torna-se covalentemente ligado a um átomo de oxigênio. As enzimas que catalisam essas oxidações são geralmente chamadas de **oxidases** ou, se o átomo de oxigênio é diretamente derivado do oxigênio molecular (O_2), **oxigenases**.

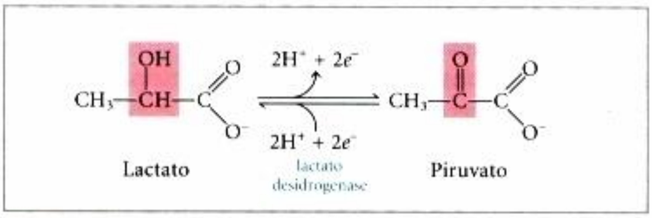


Figura 3-16 – Uma reação de oxidação-redução. A oxidação do lactato para piruvato é mostrada aqui. Nessa desidrogenação, dois elétrons e dois íons hidrogênio (o equivalente a dois átomos de hidrogênio) são removidos do C-2 do lactato, um álcool. Nas células, a reação é catalisada pela desidrogenase láctica e os elétrons são transferidos para um co-fator chamado de nicotinamida adenina dinucleotídeo. Essa reação é totalmente reversível, piruvato pode ser reduzido pelos elétrons a partir do co-fator. Os fatores que determinam a direção de uma reação serão discutidos no Capítulo 14.

Toda oxidação é acompanhada de redução, na qual um grupo que recebe elétrons adquire os elétrons removidos pela oxidação. Reações de oxidação geralmente liberam energia (imagine um incêndio no campo, em que vários compostos da madeira são oxidados pelas moléculas de oxigênio do ar). A maioria das células vivas obtém a energia necessária para o trabalho celular oxidando combustíveis, como carboidratos ou gorduras; organismos fotossintéticos podem também usar a energia da luz solar. As vias catabólicas (produtoras de energia) descritas nos Capítulos 15 a 19 são reações de oxidação-redução em cadeia que resultam na transferência de elétrons das moléculas combustíveis por meio de uma série de transportadores de elétrons até oxigênio. A afinidade alta do O_2 por elétrons torna todo o processo de transferência de elétrons altamente exergônico, fornecendo a energia que impulsiona a síntese de ATP — o objetivo central do catabolismo.

Ligações carbono-carbono são quebradas e formadas por reações de substituição nucleofílica

Uma ligação covalente pode ser quebrada de duas formas gerais (Fig. 3-17). Na quebra **homolítica**, cada átomo deixa a ligação como um radical, levando um dos dois elétrons (agora desemparelhado) que mantinha os átomos ligados. Reações homolíticas ocorrem raramente nos organismos vivos (veja Fig. 22-39 como um exemplo). Quebras **heterolíticas** são mais comuns, nas quais um átomo mantém os dois elétrons da ligação (formando um ânion), deixando o outro átomo com um elétron a menos (um cátion). Quando um segundo grupo rico em elétrons substitui o ânion que saiu, uma **substituição nucleofílica** ocorre (Fig. 3-18). Muitas reações bioquímicas envolvem interações entre **nucleófilos**, grupos funcionais ricos em elétrons e capazes de doá-los, e **eletrófilos**, grupos funcionais deficientes em elétrons, que procuram elétrons. Nucleófilos combinam com eletrófilos fornecendo-lhes elétrons. Grupos funcionais que contêm oxigênio, nitrogênio e enxofre são importantes nucleófilos biológicos (Tabela 3-4). Átomos de hidrogênio carregados positivamente (íons hidrogênio, ou prótons) e metais carregados positivamente (cátions) freqüentemente atuam como **eletrófilos** nas células. Um átomo de carbono pode atuar ou como um nucleófilo ou como um eletrófilo, dependendo de quais ligações e grupos funcionais o cercam.

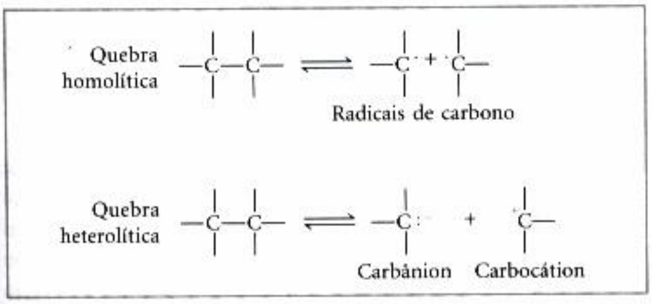


Figura 3-17 – Dois mecanismos de quebra de uma ligação C—C. Nas quebras homolíticas, cada átomo de carbono mantém um dos elétrons da ligação, resultando em dois radicais de carbono (isto é, carbonos tendo elétrons desemparelhados). Nas quebras heterolíticas, um dos dois átomos de carbono mantém os dois elétrons da ligação, produzindo um carbânion, e o outro se torna um carbocátion.

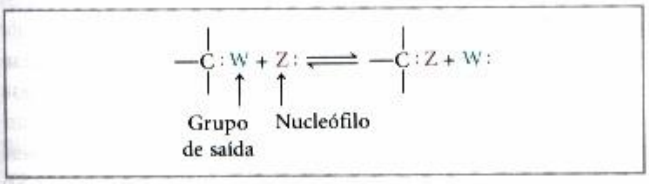
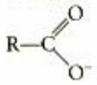
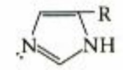
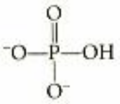


Figura 3-18 – Uma reação de substituição nucleofílica. Um nucleófilo rico em elétrons (Z) ataca um centro deficiente em elétrons (um átomo de carbono, por exemplo) e desloca um grupo nucleofílico (W), que é chamado de grupo de saída.

Tabela 3-4 – Alguns grupos funcionais que atuam como nucleófilos no interior das células*

Nome	Estrutura química
Água	$H\ddot{\underset{\cdot\cdot}{O}}H$
Íon hidróxido	$H\ddot{\underset{\cdot\cdot}{O}}:^-$
Hidroxila (álcool)	$R\ddot{\underset{\cdot\cdot}{O}}H$
Alcóxido	$R\ddot{\underset{\cdot\cdot}{O}}:^-$
Sulfidrila	RSH
Tiol	$R\ddot{\underset{\cdot\cdot}{S}}^-$
Amino	$R\ddot{N}H_2$
Carboxilato	
Imidazol	
Ortofosfato inorgânico	

* Listados em ordem decrescente. Nucleófilos mais fracos são melhores grupos de saída.

Existem dois mecanismos gerais pelos quais um nucleófilo pode substituir outro na formação de ligações carbono-carbono. No primeiro (Fig. 3-19a), o grupo de saída (o nucleófilo W, veja Fig. 3-18) parte com seus elétrons, deixando o parceiro como um carbocátion, relativamente instável (carbono carregado positivamente, um eletrófilo), antes que um grupo substituinte (Z, um nucleófilo) apareça em cena. Esse mecanismo é chamado **reação SN1** (SN1 indica substituição nucleofílica, unimolecular). No segundo tipo de substituição nucleofílica, um nucleófilo atacante (Z) chega antes que o grupo de saída (W) parta e transitoriamente se forma um intermediário pentavalente (Fig. 3-19b). Essa é uma **reação SN2** (substituição nucleofílica, bimolecular). Como a Figura 3-19 sugere, reações SN2 tipicamente resultam em uma inversão da configuração ao redor do carbono atacado após a partida do grupo de saída, enquanto reações SN1 usualmente resultam ou na retenção da configuração original ou na racemização. Em geral, nucleófilos fracos são melhores grupos de saída e os nucleófilos fortes são melhores espécies atacantes.

A condensação aldólica, catalisada pela aldolase (veja Fig. 15-4), é um exemplo de uma substituição nucleofílica, empregada para formar ligações carbono-carbono nas células. Essas reações são reversíveis; aldolase pode ligar duas espécies de três átomos de carbono para formar um açúcar de seis carbonos ou pode quebrar o açúcar de seis carbonos para formar duas espécies de três unidades de carbono cada.

Transferência de elétrons intramolecular produz rearranjos internos

Outro tipo de reação celular comum é o de rearranjo intramolecular no qual a redistribuição de elétrons resulta em isomerização, transposição de ligações duplas e rearranjos de ligações duplas cis-trans. Um exemplo de isomerização é a formação de frutose-6-fosfato a partir de glicose-6-fosfato durante o metabolismo de açúcar (Capítulo 15). Nessa reação (Fig. 3-20a), C-1 é reduzi-

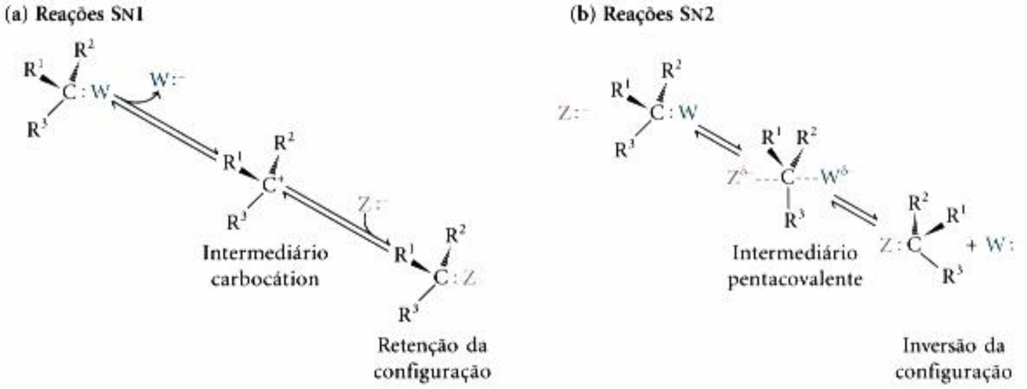

(a) Reações SN1
Intermediário carbocátion
Retenção da configuração
(b) Reações SN2
Intermediário pentacovalente
Inversão da configuração

Figura 3-19 – Duas classes de reações de substituição nucleofílica. (**a**) SN1: o grupo de saída (W) parte com os elétrons da ligação, deixando um carbocátion, antes do nucleófilo atacante (Z) chegar. (**b**) SN2: o nucleófilo atacante (Z) aproxima-se de um lado do carbono eletrofílico enquanto o grupo de saída (W) permanece ligado ao outro lado, resultando em um intermediário pentacovalente. A saída de W deixa o composto substituído com uma configuração completamente invertida no átomo de carbono reagente.

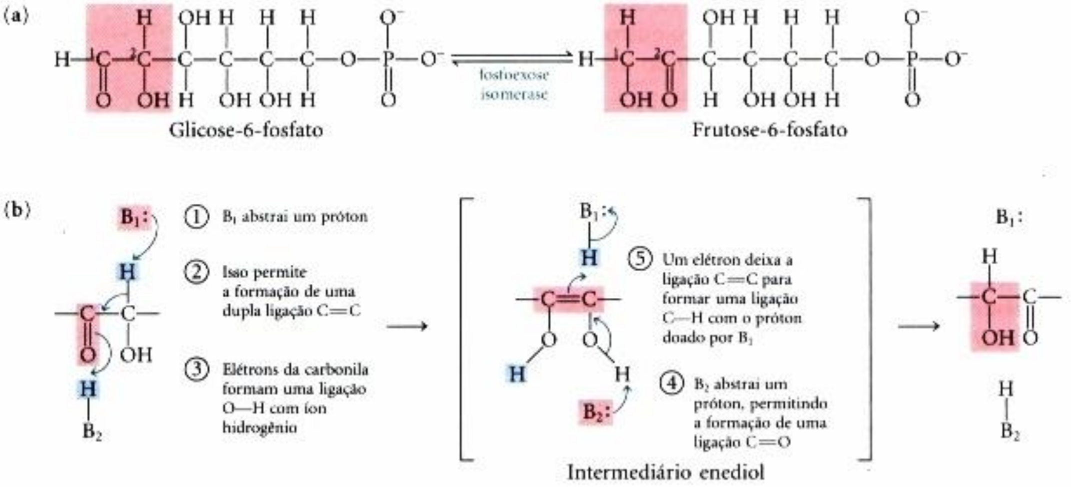

(a)
Glicose-6-fosfato
fosfoexose isomerase
Frutose-6-fosfato
(b)
① B₁ abstrai um próton
② Isso permite a formação de uma dupla ligação C=C
③ Elétrons da carbonila formam uma ligação O—H com íon hidrogênio
⑤ Um elétron deixa a ligação C=C para formar uma ligação C—H com o próton doado por B₁
④ B₂ abstrai um próton, permitindo a formação de uma ligação C=O
Intermediário enediol

Figura 3-20 – Uma reação de isomerização. (**a**) A conversão de glicose-6-fosfato para frutose-6-fosfato, uma reação do metabolismo de açúcar catalisada pela fosfoexose isomerase. (**b**) Esta reação ocorre por meio de um intermediário enediol. A seta azul curva representa o movimento dos elétrons da ligação do nucleófilo (vermelho) para o eletrófilo (azul). B_1 e B_2 são grupos básicos da enzima; eles são capazes de doar e ceder íons hidrogênio (prótons) conforme a reação ocorre.

do (de aldeído para álcool) e C-2 é oxidado (de álcool para cetona). Na Figura 3-20b, em que se mostram os detalhes dos movimentos do elétron que resulta em isomerização, empregamos a convenção de diagramas *"electron-pushing"*, os quais serão usados para indicar os mecanismos de reação por todo o livro. Setas azuis curvas mostram o movimento dos elétrons, à medida que a reação ocorre.

Uma transposição simples de uma ligação C=C ocorre durante o metabolismo do ácido oléico, um ácido graxo (veja Fig. 17-9), e exemplos espetaculares de reposicionamento de ligações duplas serão vistos na síntese de colesterol (veja Fig. 21-35).

Reações de transferência de grupos ativam intermediários metabólicos

Em metabolismo, um tema geral e importante é a necessidade de ligação a um intermediário metabólico de um bom grupo de saída com a finalidade de "ativá-lo", para que com isso ocorra a reação subseqüente. Entre os melhores grupos de saída nas reações de substituição nucleofílicas (Tabela 3-4) estão o ortofosfato inorgânico (a forma ionizada de H_3PO_4 em pH neutro, uma mistura de $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}, comumente abreviado de P_i) e pirofosfato inorgânico ($P_2O_7^{6-}$, abreviado de PP_i). Ésteres e anidridos do ácido fosfórico têm papel central na química celular. Substituição nucleofílica na qual o grupo fosforil ($—PO_3^{2-}$) serve como um grupo de saída ocorre em centenas de reações metabólicas, isso porque essa substituição se torna mais favorável pela ligação de um grupo fosforil em vez de um grupo de saída pobre como é —OH.

Fósforo pode formar cinco ligações covalentes. A representação convencional do P_i (Fig. 3-21a) com três ligações P—O e uma ligação P=O não é correta. No P_i, as quatro ligações P—O possuem um caráter de dupla ligação, e o ânion tem uma estrutura tetraédrica (Fig. 3-21b). Como o oxigênio é mais eletronegativo que o fósforo, os elétrons não são compartilhados igualmente. O fósforo central possui uma carga positiva e pode atuar como um eletrófilo. Em um grande número de reações metabólicas, um grupo fosforil ($—PO_3^{2-}$) é transferido do ATP para um álcool (formando um éster de fosfato) (Fig. 3-21c) ou para um ácido carboxílico (formando um anidrido misto; veja Fig. 3-5). Quando um nucleófilo ataca o átomo de fósforo eletrofílico no ATP, uma estrutura pentacovalente relativamente estável é formada, como um intermediário de reação (Fig. 3-21d). Com a

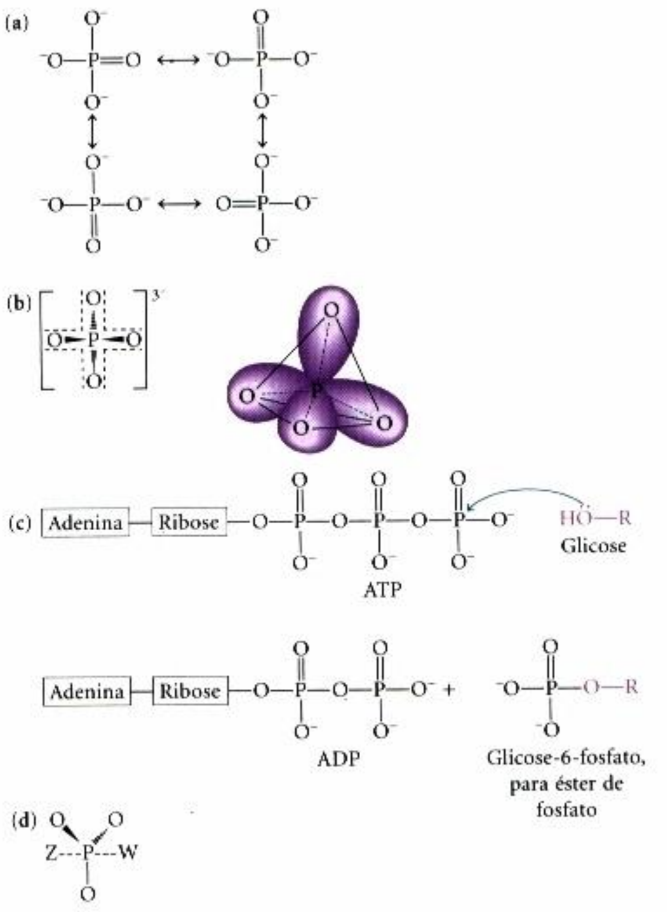


Figura 3-21 – Vias alternativas para mostrar a estrutura do ortofosfato inorgânico. (**a**) Representação não apropriada, três oxigênios são ligados ao fósforo por ligação simples e o quarto é ligado por ligação dupla, permitindo as quatro estruturas diferentes de ressonância mostradas; (**b**) as quatro estruturas de ressonância podem ser representadas com maior precisão, mostrando o caráter de dupla ligação das quatro ligações P—O. Os orbitais híbridos, assim representados, são arranjados em um tetraedro com o P em seu centro. (**c**) Quando um nucleófilo Z (neste caso, o —OH no C-6 da glicose) ataca ATP, ele desloca ADP (W). Nesta reação SN2, um intermediário pentacovalente (**d**) forma-se transitoriamente.

retirada do grupo de saída (ADP), a transferência de um grupo fosforil é completa. A grande família de enzimas que catalisa a transferência de grupos fosforil, tendo ATP como doador, é chamada de quinase (do grego *kinein*, "mover"). Hexoquinase, por exemplo, "move" um grupo fosforil do ATP para a glicose.

Grupos fosforil não são os únicos ativadores desse tipo. Tioálcoois (tióis), nos quais o átomo de oxigênio de um álcool é substituído por um átomo de enxofre, também são bons grupos de saída. Tióis ativam ácidos carboxílicos pela formação de tioésteres (ésteres de tiol) com eles (Fig. 3-5). Encontra-se um grande número de casos, incluindo-se as reações catalisadas pelas acil transferases na síntese de lipídios (veja Fig. 21-2), na qual a substituição nucleofílica do carbono da carbonila de um tioéster resulta na transferência de um grupo acil para outra metade da molécula.

Biopolímeros são formados por condensações

As subunidades monoméricas que compõem proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos são ligadas por reações de deslocamento nucleofílico que substituem um bom grupo de saída. Por exemplo, a ligação de duas moléculas de aminoácidos para formar um dipeptídeo poderia ocorrer por um mecanismo simples observado na Figura 3-22a. No entanto, —OH é um grupo de saída pobre, a reação por esse mecanismo não é eficiente. Células solucionam esse problema, primeiramente, pela ligação de um grupo de saída melhor, uma molécula de RNA pequena (RNA de transferência, cerca de 75 nucleotídeos de comprimento) no grupo α-carboxil do aminoácido (ligação éster). Isso ativa o grupo carboxil para condensação com o α-amino grupo do outro aminoácido (Fig. 3-22b). Estratégias semelhantes são empregadas para a biossíntese de ácidos nucléicos e polissacarídeos.

Macromoléculas podem ser quebradas por reações de hidrólise, nas quais H_2O é o nucleófilo que ataca, deslocando uma subunidade monomérica ou um fragmento menor do polímero (Fig. 3-22c). Enzimas que catalisam hidrólise de biopolímeros (hidrolases) são essenciais no processo digestivo e servem também para regular o nível de macromoléculas críticas, como são os RNA mensageiros.

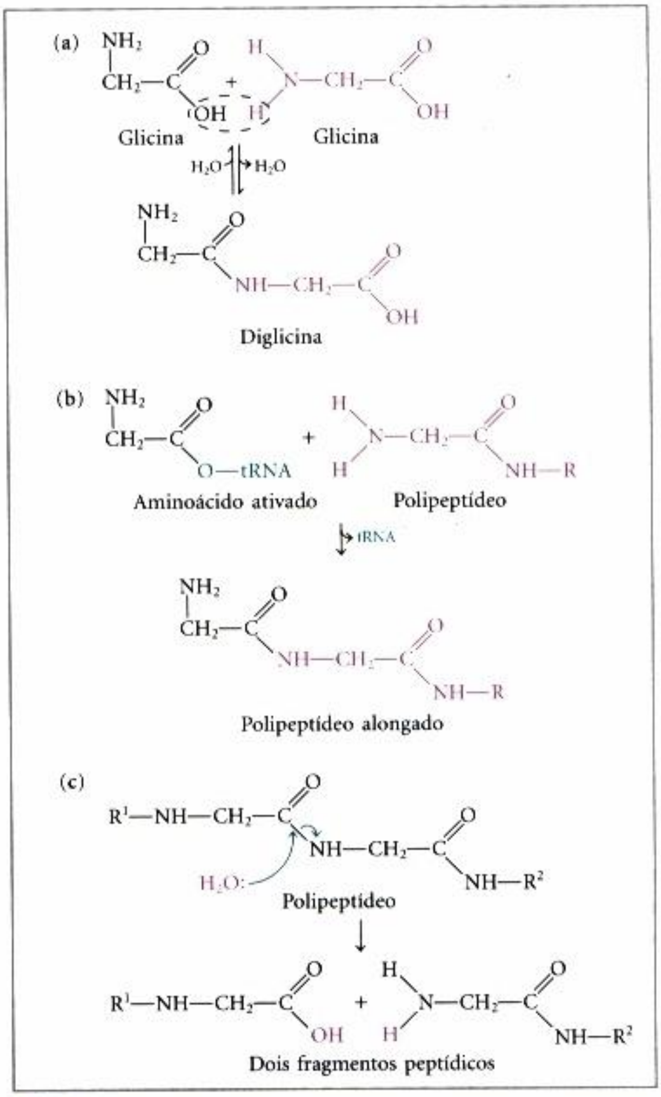


Figura 3-22 – Condensação e hidrólise. A formação e a hidrólise de uma ligação peptídica são mostradas aqui. (**a**) Remoção do elemento água de duas moléculas do aminoácido glicina produz uma ligação peptídica, mas, por não ser o grupo —OH um bom grupo de saída, essa reação não é favorável. (**b**) Nas células, aminoácidos são ativados antes da polimerização pela ligação de um grupo de saída melhor que o —OH, um RNA pequeno (RNA de transferência ou tRNA) que forma um éster de oxigênio com um grupo α-carboxil. (**c**) A hidrólise de uma ligação peptídica (mostrada aqui em um polipeptídeo) é essencialmente o reverso da reação em (**a**). H_2O faz um ataque nucleofílico no carbono da carbonila, deslocando o nitrogênio do grupo α-amino.

Macromoléculas e Suas Subunidades Monoméricas

Muitas das moléculas encontradas no interior das células são macromoléculas, polímeros de alto peso molecular construídos com precursores relativamente simples. Os polissacarídeos, as proteínas e os ácidos nucléicos, os quais podem ter pesos moleculares variando de dezenas de milhares até bilhões (como no caso do DNA), são construídos pela polimerização de subunidades relativamente pequenas, de peso molecular ao redor de 500 ou menos. A síntese das macromoléculas é uma atividade celular que pode ser classificada como forte consumidora de energia. As macromoléculas, por sua vez, podem ser arranjadas em complexos supramoleculares formando unidades funcionais como os ribossomos, que são construídos com cerca de 70 proteínas diferentes e várias moléculas de RNA diferentes.

Os principais constituintes das células são macromoléculas

A Tabela 3-5 mostra as principais classes de biomoléculas em um organismo unicelular típico, a *Escherichia coli*. A água é o composto simples mais abundante na *E. coli* e em todas as outras células e organismos. Em todos os tipos de células, quase toda a matéria sólida é substância orgânica e está presente em quatro formas principais: proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e lipídios. Os sais inorgânicos e os elementos minerais, por outro lado, constituem apenas uma fração muito pequena do peso seco total.

Tabela 3-5 – Componentes moleculares de uma célula da *E. coli*

	Porcentagem do peso total da célula	Número aproximado das diferentes espécies moleculares
Água	70	1
Proteínas	15	3.000
Ácidos nucléicos		
DNA	1	1
RNA	6	> 3.000
Polissacarídeos	3	5
Lipídios	2	20
Subunidades monoméricas e intermediários	2	500
Íons inorgânicos	1	20

As **proteínas**, longos polímeros de aminoácidos, constituem, ao lado da água, a maior fração das células. Algumas proteínas têm atividade catalítica e funcionam como enzimas, outras servem como elementos estruturais e ainda outras transportam sinais específicos (no caso dos receptores) ou substâncias específicas (no caso das proteínas de transporte) para o interior ou o exterior das células. As proteínas são talvez as mais versáteis das biomoléculas. Os **ácidos nucléicos**, DNA e RNA, são polímeros de nucleotídeos. Eles armazenam, transmitem e transcrevem a informação genética. Os **polissacarídeos**, polímeros de açúcares simples, como a glicose, têm duas funções principais: servem como armazenadores de alimentos, liberadores de energia e como elementos estruturais extracelulares. Polímeros pequenos de açúcares (oligossacarídeos) ligados a proteínas ou a lipídios na superfície celular servem como sinais celulares específicos. Entre seus inúmeros papéis, os **lipídios**, derivados oleosos dos hidrocarbonetos, servem principalmente como componentes estruturais das membranas e como forma de armazenamento de alimentos ricos em energia. Todas essas quatro classes de grandes biomoléculas são sintetizadas em reações de condensação. Nas macromoléculas (proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos), o número de subunidades monoméricas é muito grande. As proteínas têm pesos moleculares que variam de 5.000 até um milhão; os ácidos nucléicos têm pesos moleculares que variam na casa dos vários milhões; os polissacarídeos, como o amido, também têm pesos moleculares na casa dos vários milhões. As moléculas lipídicas individuais são muito menores (M_r 750 a 1.500) e não são classificadas como macromoléculas. Entretanto, quando um grande número de moléculas lipídicas se associa não-covalentemente, resulta em estruturas muito grandes. As membranas celulares são construídas por enormes agregados que contêm milhões de moléculas de lipídios.

As macromoléculas são construídas com subunidades monoméricas

Embora os organismos vivos contenham um número muito grande de proteínas e de ácidos nucléicos diferentes, uma simplicidade fundamental está na base das suas estruturas (Capítulo 1). As subunidades monoméricas simples, com as quais todas as proteínas e todos os ácidos nucléicos são construídos, são em número pequeno e idênticas em todas as espécies. As proteínas e os ácidos nucléicos são as duas **macromoléculas informacionais:** cada proteína e cada ácido nucléico têm uma seqüência de subunidades característica e rica em informação (Fig. 3-23).

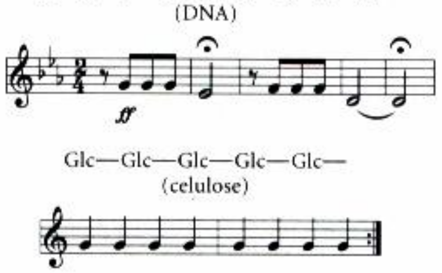


Figura 3-23 – Macromoléculas informacionais e estruturais. As letras A, T, C e G representam os quatro desoxirribonucleotídeos do DNA, e glicose (Glc) é a subunidade monomérica repetitiva do amido e da celulose. O número de combinações possíveis dos quatro desoxirribonucleotídeos é virtualmente ilimitado, como o número de melodias possíveis de serem compostas com um pequeno número de notas musicais. Um polímero de um único tipo de subunidade é monótono e pobre em informação.

Os polissacarídeos construídos apenas com um tipo de unidade ou de duas unidades diferentes e alternadas não são moléculas informacionais no mesmo sentido em que o são as proteínas e os ácidos nucléicos, entretanto os polissacarídeos complexos feitos de seis ou mais tipos diferentes de açúcares, ligados em cadeias ramificadas, têm as variedades estruturais e estereoquímicas capazes de habilitá-los a transportar informações reconhecíveis por outras macromoléculas.

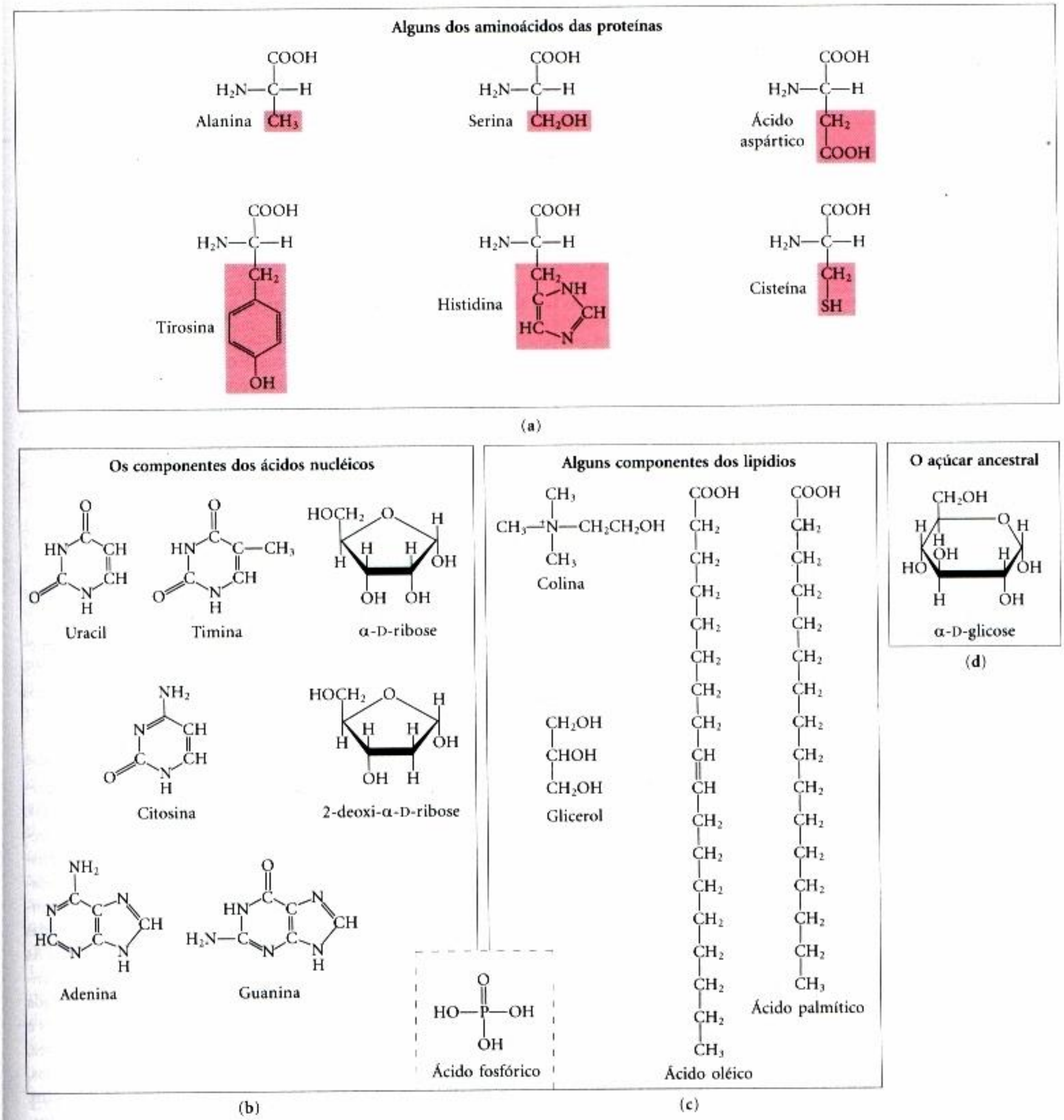
As subunidades monoméricas têm estruturas simples

A Figura 3-24 mostra as estruturas de algumas unidades monoméricas das biomoléculas grandes arranjadas em famílias. Vinte aminoácidos diferentes são encontrados nas proteínas, todos têm um grupo amino (um grupo imino no caso da prolina) e um grupo carboxila ligado ao átomo de carbono, designado de carbono α. Esses α-aminoácidos diferem uns dos outros somente pela cadeia lateral (Fig. 3-24a).

As unidades estruturais recorrentes de todos os ácidos nucléicos são oito nucleotídeos diferentes; quatro tipos de nucleotídeos são unidades estruturais do DNA, e os outros quatro são unidades do RNA (Fig. 3-24b). Cada nucleotídeo é feito de três componentes: (1) uma base orgânica nitrogenada; (2) um açúcar de cinco átomos de carbono e (3) fosfato. Os oito nucleotídeos diferentes do DNA e do RNA são construídos a partir de cinco bases orgânicas diferentes combinadas com dois açúcares diferentes.

Os lipídios são construídos a partir de relativamente poucos tipos de subunidades. A maioria das moléculas lipídicas contém um ou mais ácidos graxos de cadeia longa, dos quais o palmitato e o oleato são os compostos típicos (Fig. 3-24c). Muitos lipídios também contêm um álcool, por exemplo, o glicerol, e alguns contêm fosfato.

Os polissacarídeos mais abundantes da natureza, amido e celulose, consistem de unidades repetidas de D-glicose (Fig. 3-24d). Outros polissacarídeos são compostos de uma variedade de moléculas de açúcares derivados de glicose.


Alguns dos aminoácidos das proteínas
Alanina
Serina
Ácido aspártico
Tirosina
Histidina
Cisteína
Os componentes dos ácidos nucléicos
Uracil
Timina
α-D-ribose
Citosina
2-deoxi-α-D-ribose
Adenina
Guanina
Ácido fosfórico
Alguns componentes dos lipídios
Colina
Glicerol
Ácido oléico
Ácido palmítico
O açúcar ancestral
α-D-glicose

(a)

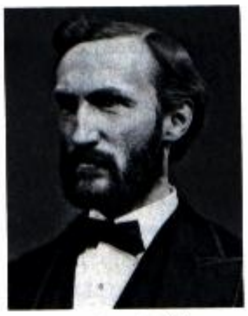
(b)

(c)

(d)

Figura 3-24 – Os compostos orgânicos a partir dos quais estruturas celulares muito maiores são construídas: o alfabeto da bioquímica. Aqui são mostrados (**a**) seis dos 20 aminoácidos com os quais as proteínas de todos os organismos são construídas (as cadeias laterais estão sombreadas em vermelho); (**b**) as cinco bases nitrogenadas, dois açúcares com cinco átomos de carbono cada um e o ácido fosfórico, a partir desses compostos são formados todos os ácidos nucléicos; (**c**) cinco compostos encontrados em muitos dos lipídios de membranas e (**d**) α-D-glicose, a maioria dos carboidratos são derivados da molécula desse açúcar. Note que o ácido fosfórico é uma subunidade componente de ambos, ácidos nucléicos e lipídios de membranas. Todos os compostos estão representados na sua forma não-ionizada.

Assim, apenas umas três dúzias de compostos orgânicos diferentes são os progenitores da maioria das biomoléculas. Cada um dos compostos na Figura 3-24 tem uma função múltipla nos organismos vivos (Fig. 3-25). Os aminoácidos não são apenas as subunidades monoméricas das proteínas; alguns agem como neurotransmissores e como precursores de hormônios e toxinas. A adenina serve tanto como subunidade na estrutura dos ácidos nucléicos e do ATP, como neurotransmissora. Os ácidos graxos servem como componentes de membranas lipídicas complexas, como gorduras ricas em energia e que funcionam como reserva de alimentos e também como precursores de um grupo de moléculas sinalizadoras potentes, os eicosanóides. D-glicose é a subunidade monomérica do amido e da celulose e também é o precursor de outros açúcares como a D-manose e a sacarose.



J. Willard Gibbs
(1839-1903)

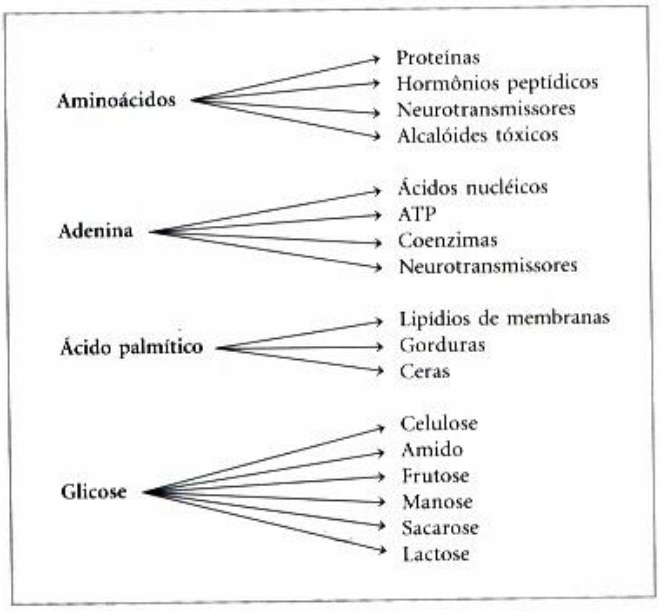


Figura 3-25 – Cada composto simples na Figura 3-24 é um precursor de muitos outros tipos de biomoléculas.

A condensação entre as subunidades cria ordem e requer energia

É extremamente improvável que os aminoácidos em uma mistura venham a se condensar espontaneamente em uma proteína com uma seqüência única. Essa condensação de moléculas pequenas em uma macromolécula representaria um aumento na organização do sistema, no caso "uma população de moléculas", o que não estaria de acordo com a segunda lei da termodinâmica (Capítulo 14) que afirma a tendência dos processos químicos e físicos ocorrerem no universo em direção a um aumento da desordem. É, portanto, necessário fornecer energia livre ao sistema (a célula), para conduzir a síntese de macromoléculas a partir de suas subunidades monoméricas (Capítulo 1).

A desordem dos componentes de um sistema químico é expressa como a **entropia**, simbolizada por S. Qualquer mudança na desordem do sistema é uma variação na entropia, ΔS, que tem um valor positivo quando a desordem aumenta. Quem desenvolveu a teoria das variações energéticas durante as reações químicas foi J. Willard Gibbs; ele mostrou que o conteúdo de energia livre (G) de qualquer sistema isolado pode ser definido em termos de três quantidades: a entalpia (H) que reflete o tipo e o número de ligações envolvidas (veja pág. 50); a entropia (S); e T, a temperatura absoluta (Kelvin). A definição de energia livre é: $G = H - TS$. Assim, quando uma reação química ocorre à temperatura constante, a variação da energia livre é determinada por ΔH, refletindo os tipos e o número de ligações químicas em interações não-covalentes, quebradas e formadas, e por ΔS, a mudança na desordem do sistema:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$$

No Capítulo 1 vimos que um processo tende a ocorrer espontaneamente apenas quando ΔG é negativo. Além disso, células dependem de muitas moléculas, tais como proteínas e ácidos nucléicos, para as quais energia livre de formação é positiva: elas são menos estáveis e mais ordenadas do que uma mistura de seus componentes monoméricos. Para superar o déficit de energia livre de reações termodinamicamente desfavoráveis (endergônicas), células acoplam essas reações a outras reações que liberam energia livre (reações exergônicas), de maneira que todo o processo seja exergônico: a soma das variações de energia livre é negativa. A fonte usual de energia livre em reações biológicas acopladas é a energia liberada pela hidrólise de ligações do anidrido do ácido fosfórico (fosfoanidrido), como aquelas que conectam grupos fosfato (representados como Ⓟ) no ATP:

$$\text{Aminoácidos} \longrightarrow \text{polímero} \qquad \Delta G_1 \text{ é positiva (endergônica)}$$

$$—Ⓟ—Ⓟ \longrightarrow Ⓟ + Ⓟ \qquad \Delta G_2 \text{ é negativa (exergônica)}$$

Quando essas reações são acopladas, a soma de ΔG_1 e ΔG_2 é negativa (o processo global é exergônico). Por meio dessa estratégia, células são capazes de sintetizar e manter polímeros ricos em informação (DNA, RNA e proteína) e essenciais à vida.

A estrutura celular é hierarquizada

As subunidades monoméricas na Figura 3-24 são muito pequenas, quando comparadas com as macromoléculas biológicas. Uma molécula de um aminoácido, tal como a alanina, tem menos de 0,5nm de comprimento. A hemoglobina, proteína transportadora de oxigênio nos eritrócitos, consiste de aproximadamente 600 aminoácidos ligados covalentemente em quatro longas cadeias, estas são enroladas em formas globulares e associadas em uma estrutura tetramérica, com um diâmetro de 5,5nm. As moléculas de proteínas por sua vez são pequenas, quando comparadas com os ribossomos (perto de 20nm de diâmetro); cada um dos quais contém mais ou menos 70 proteínas diferentes e várias moléculas diferentes de RNA. Os ribossomos, por sua vez, são muito menores do que as organelas, como as mitocôndrias, por exemplo, as quais têm, tipicamente, 1.000nm de diâmetro. É longo o salto entre uma única biomolécula e as grandes estruturas celulares que podem ser vistas ao microscópio óptico. A Figura 3-26 ilustra a hierarquia estrutural da organização celular.

Nas proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos, as subunidades monoméricas individuais estão ligadas por ligações covalentes. Em contraste, nos complexos supramoleculares, as

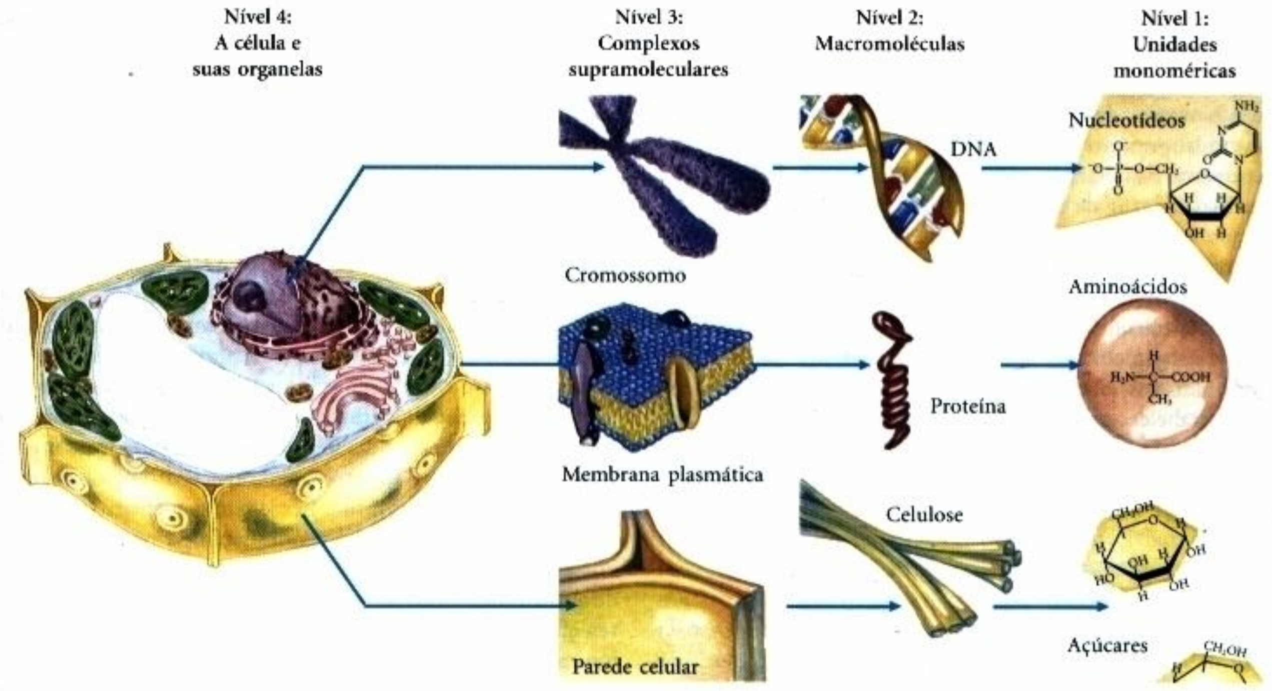


Figura 3-26 – A hierarquia estrutural na organização molecular das células. O núcleo desta célula vegetal, por exemplo, contém vários tipos de complexos supramoleculares, incluindo os cromossomos. Os cromossomos constituem-se de macromoléculas — DNA e muitas proteínas diferentes. Cada tipo de macromolécula é construído de subunidades simples — DNA, por exemplo, a partir de desoxirribonucleotídeos.

numerosas e diferentes macromoléculas são mantidas unidas por interações não-covalentes — individualmente muito mais fracas do que as ligações covalentes. Entre estas estão as pontes de hidrogênio (entre grupos polares), interações iônicas (entre grupos carregados), interações hidrofóbicas (entre grupos não-polares em soluções aquosas) e interações de van der Waals, todas as quais têm energia de apenas poucos quilojoules (kJ), comparadas com as ligações covalentes as quais têm energia de 200 a 900kJ/mol (Tabela 3-3). A natureza dessas interações não-covalentes será discutida no próximo capítulo. Nos complexos supramoleculares, o grande número de interações fracas entre as macromoléculas estabiliza as estruturas não-covalentes finais, produzindo sua estrutura "nativa" única.

Embora as subunidades monoméricas das macromoléculas sejam muito menores que as células e as organelas, elas influenciam a forma e a função dessas estruturas muito maiores. Na anemia falciforme, uma doença humana hereditária, a molécula da hemoglobina é defeituosa. Um resíduo de ácido glutâmico ocorre na posição 6 nas duas cadeias β da hemoglobina de indivíduos normais. Nas pessoas com anemia falciforme, nessa posição ocorre um resíduo de valina. Essa simples diferença na seqüência de 146 aminoácidos da cadeia β afeta apenas uma pequena porção da molécula, como será explicado no Capítulo 7. Entretanto ela é responsável por um defeito tal nessa molécula de hemoglobina, que esta forma grandes agregados no interior dos eritrócitos, os quais, por isso, deformam-se (falcizam-se) e funcionam anormalmente.

Evolução Pré-Biótica

O fato de todas as macromoléculas biológicas serem construídas com as mesmas três dúzias de subunidades torna provável que todos os organismos vivos descendam de uma única linhagem celular primordial, cuja química fundamental seria reconhecida até mesmo hoje. Além disso, esses compostos orgânicos primordiais devem ter sido adaptativamente selecionados de forma que sistemas celulares foram refinados para desempenhar as transformações energéticas e de auto-replicação, que são características das células vivas.

As primeiras biomoléculas apareceram por evolução química

Agora chegamos a um problema do tipo quebra-cabeças: além da sua presença nos organismos vivos, os compostos orgânicos, incluindo as biomoléculas básicas, ocorrem apenas em pequeníssimas quantidades na crosta terrestre, isto é, nos continentes, nos mares e na atmosfera. Como foi possível aos primeiros organismos vivos adquirirem seus componentes orgânicos básicos? Em 1922, o bioquímico Alexander I. Oparin propôs a teoria da origem precoce da vida na história da Terra, postulando que a atmosfera foi, naquele tempo, muito diferente da que existe hoje. Rica em metano, amônia, água e essencialmente destituída de oxigênio, ela era uma atmosfera redutora, muito diferente do ambiente oxidante dos tempos atuais. Na teoria de Oparin, a energia elétrica das descargas dos relâmpagos, ou a energia calorífica dos vulcões, fez com que a amônia, o metano, o vapor d'água e outros componentes da atmosfera primitiva reagissem formando compostos orgânicos simples. Esses compostos se dissolveram então nos mares antigos, os quais, ao longo de muitos milênios, tornaram-se enriquecidos com uma grande variedade de compostos orgânicos simples. Nessa solução quente ("sopa pré-biótica" ou "sopa primordial"), algumas moléculas orgânicas tiveram tendência maior que outras para se associarem em grandes compostos, os quais, por milhões de anos de evolução, por sua vez, associaram-se a membranas e catalisadores (enzimas), os quais vieram juntar-se uns aos outros para tornarem-se precursores das células primitivas. Por muitos anos, as opiniões de Oparin permaneceram como especulações não testadas e impossíveis de assim o serem, até que um experimento surpreendente foi realizado usando equipamento simples.

A evolução química pode ser simulada no laboratório

Um experimento clássico sobre a origem abiótica (não-biológica) das biomoléculas foi desenvolvido, em 1953, por Stanley Miller no laboratório de Harold Urey. Miller submeteu misturas gasosas de NH_3, CH_4, vapor d'água e H_2 a centelhas elétricas produzidas a partir de um par de elétrodos (simulação de relâmpagos) por períodos de uma semana ou mais (Fig. 3-27), e então analisou o conteúdo do frasco de reação. A fase gasosa da mistura resultante continha CO e CO_2, bem como os compostos químicos iniciais. A fase aquosa continha uma variedade de compostos orgânicos que incluiam alguns aminoácidos, hidroxiácidos, aldeídos, álcoois e ácido cianídrico (HCN). Esse experimento estabeleceu a possibilidade da produção abiótica de biomoléculas em tempos relativamente curtos e em condições relativamente suaves.

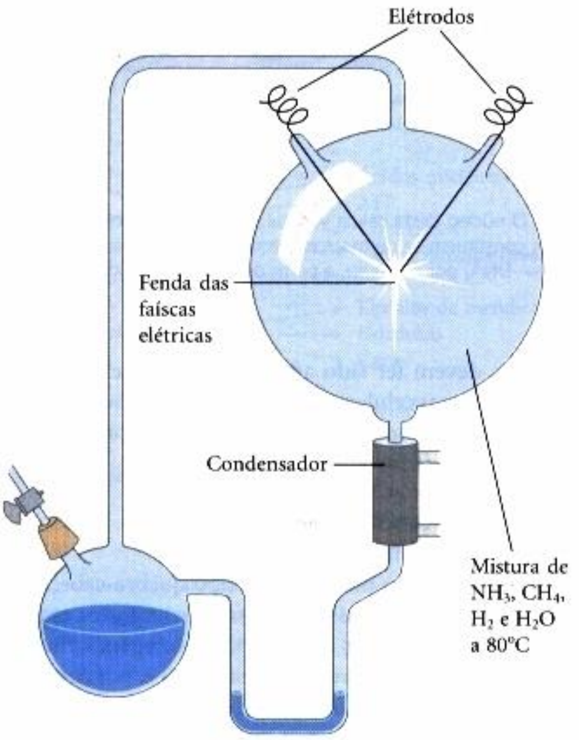

Elétrodos
Fenda das faíscas elétricas
Condensador
Mistura de NH_3, CH_4, H_2 e H_2O a 80°C

Figura 3-27 – Aparelho de descargas elétricas empregado por Miller e Urey em experiências que demonstram a formação abiótica de compostos orgânicos, sob as possíveis condições atmosféricas da Terra primitiva. Depois de submeter o conteúdo do sistema gasoso contido no aparelho a descargas elétricas, os produtos foram separados por condensação. Algumas biomoléculas, aminoácidos por exemplo, estavam entre esses produtos (veja Tabela 3-6).

Vários melhoramentos permitiram repetir os experimentos de Miller e Urey de forma mais refinada, o que tem produzido evidências muito fortes de que uma larga variedade de biomoléculas, incluindo proteínas e ácidos nucléicos, podem ter sido produzidas espontaneamente a partir de materiais que estavam, provavelmente, presentes na Terra no tempo em que a vida apareceu.

Continuações recentes dos experimentos de Miller empregaram "atmosferas" que incluem CO_2 e HCN e tecnologias melhoradas de identificação de diminutas quantidades de produtos. Assim, a formação de centenas de compostos orgânicos pode ser demonstrada (Tabela 3-6). Esses compostos incluem os aminoácidos comuns, uma grande variedade de ácidos mono, di e tricarboxílicos, ácidos graxos, adenina e formaldeído. Em certas condições, o formaldeído polimeriza-se para formar açúcares que contêm três, quatro, cinco ou seis átomos de carbono. Em adição aos muitos monômeros que se formam nesses experimentos, aparecem também polímeros de nucleotídeos (ácidos nucléicos) e aminoácidos (proteínas). Alguns dos produtos de autocondensação do ácido cianídrico também são promotores efetivos dessas reações de polimerização, e várias espécies iônicas presentes na superfície da Terra (Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}) também aumentam a velocidade de polimerização. As fontes efetivas de energia para a formação desses compostos incluem calor, luz visível e ultravioleta, raios X, radiação gama, ultra-som e ondas de choque mecânico, além de bombardeamento com partículas alfa e beta.

Sucintamente, experimentos laboratoriais sobre a formação espontânea de biomoléculas em condições pré-bióticas forneceram boa evidência de que muitos componentes químicos das células vivas, incluindo polipeptídeos e RNA, podem-se formar nessas condições. Pequenos polímeros de RNA podem agir como catalisadores em reações biologicamente significativas (Capítulo 26), e é razoável que o RNA tenha desempenhado um papel crucial na evolução pré-biótica, tanto como catalisador, como repositório de informação.

Se a vida na Terra progrediu através desse processo de evolução química, é provável que vida tenha surgido também em planetas de outros sistemas solares. Muitos compostos pré-bióticos, tais como HCN, ácido fórmico, cianoacetileno, foram encontrados em cometas, nas atmosferas de Júpiter, Saturno e Titã (a lua de Saturno) e na poeira cósmica do espaço interestelar. Análises do meteorito Murchison, que caiu na Terra em 1969, revelou a presença de aminoácidos, hidroxiácidos, purinas e pirimidinas. É concebível, portanto, que os precursores orgânicos, para a evolução da vida na Terra, originaram-se de algum lugar do sistema solar.

Tabela 3-6 – Alguns dos produtos formados em condições pré-bióticas

Ácidos carboxílicos	Bases dos ácidos nucléicos	Aminoácidos	Açúcares
Ácido fórmico	Adenina	Glicina	Pentoses e hexoses lineares e ramificadas
Ácido acético	Guanina	Alanina	
Ácido propiônico	Xantina	Ácido α-aminobutírico	
Ácidos graxos (C_4—C_{10}) lineares e ramificados	Hipoxantina	Valina	
Ácido glicólico	Citosina	Leucina	
Ácido láctico	Uracina	Isoleucina	
Ácido succínico		Prolina	
		Ácido aspártico	
		Ácido glutâmico	
		Serina	
		Treonina	

Fonte: Retirado de Miller SL. (1987) Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 17-27.

As moléculas de RNA podem ter sido os primeiros genes e catalisadores

Nos organismos atuais, os ácidos nucléicos codificam a informação genética que especifica a estrutura das enzimas, e as enzimas têm a capacidade de catalisar a replicação e a reparação dos ácidos nucléicos. A dependência mútua dessas duas classes de biomoléculas coloca a questão: o que veio primeiro, o DNA ou a proteína?

A resposta pode ser: nenhum dos dois. A descoberta de que as moléculas de RNA podem agir como catalisadoras em sua própria formação sugere que o RNA pode ter sido o primeiro gene *e* o primeiro catalisador. De acordo com esse cenário (Fig. 3-28), um dos primeiros estágios da evolução biológica foi a formação por acaso, na sopa primordial, de uma molécula de RNA que tinha a capacidade de catalisar a formação de outras moléculas de RNA com a mesma seqüência — um RNA autoduplicador e autoperpetuador. A concentração de uma molécula de RNA automultiplicadora deveria aumentar exponencialmente, pois uma molécula formaria duas, duas formariam quatro, e assim sucessivamente. A fidelidade dessa auto-replicação era, presumivelmente, tão perfeita, que o processo geraria muitas variantes de RNA, algumas das quais poderiam ser auto-replicadoras ainda melhores. Na competição pelos nucleotídeos, venceriam as seqüências mais eficientes em autoduplicar-se, e os autoduplicadores menos eficientes desapareceriam da população.

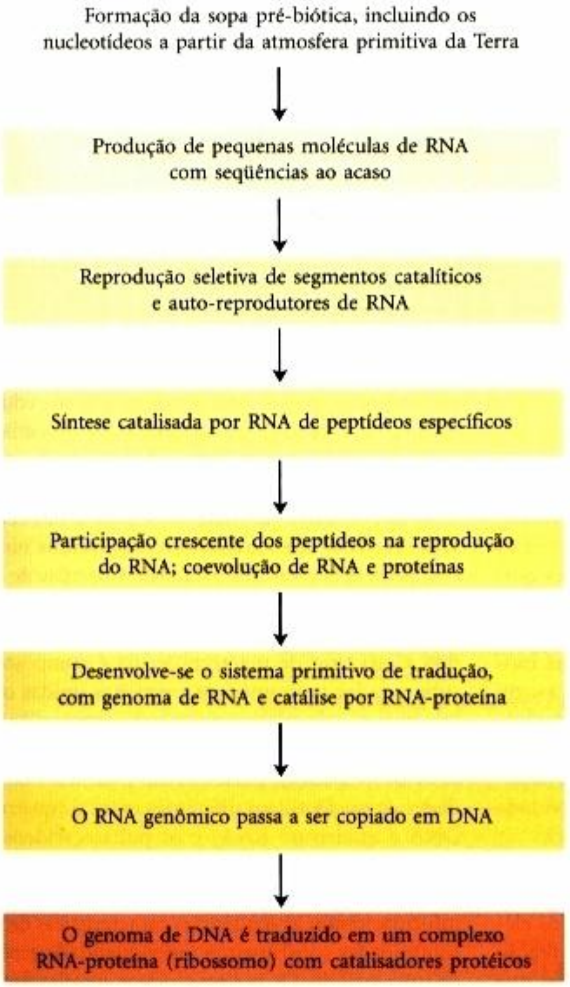

Formação da sopa pré-biótica, incluindo os nucleotídeos a partir da atmosfera primitiva da Terra
Produção de pequenas moléculas de RNA com seqüências ao acaso
Reprodução seletiva de segmentos catalíticos e auto-reprodutores de RNA
Síntese catalisada por RNA de peptídeos específicos
Participação crescente dos peptídeos na reprodução do RNA; coevolução de RNA e proteínas
Desenvolve-se o sistema primitivo de tradução, com genoma de RNA e catálise por RNA-proteína
O RNA genômico passa a ser copiado em DNA
O genoma de DNA é traduzido em um complexo RNA-proteína (ribossomo) com catalisadores protéicos

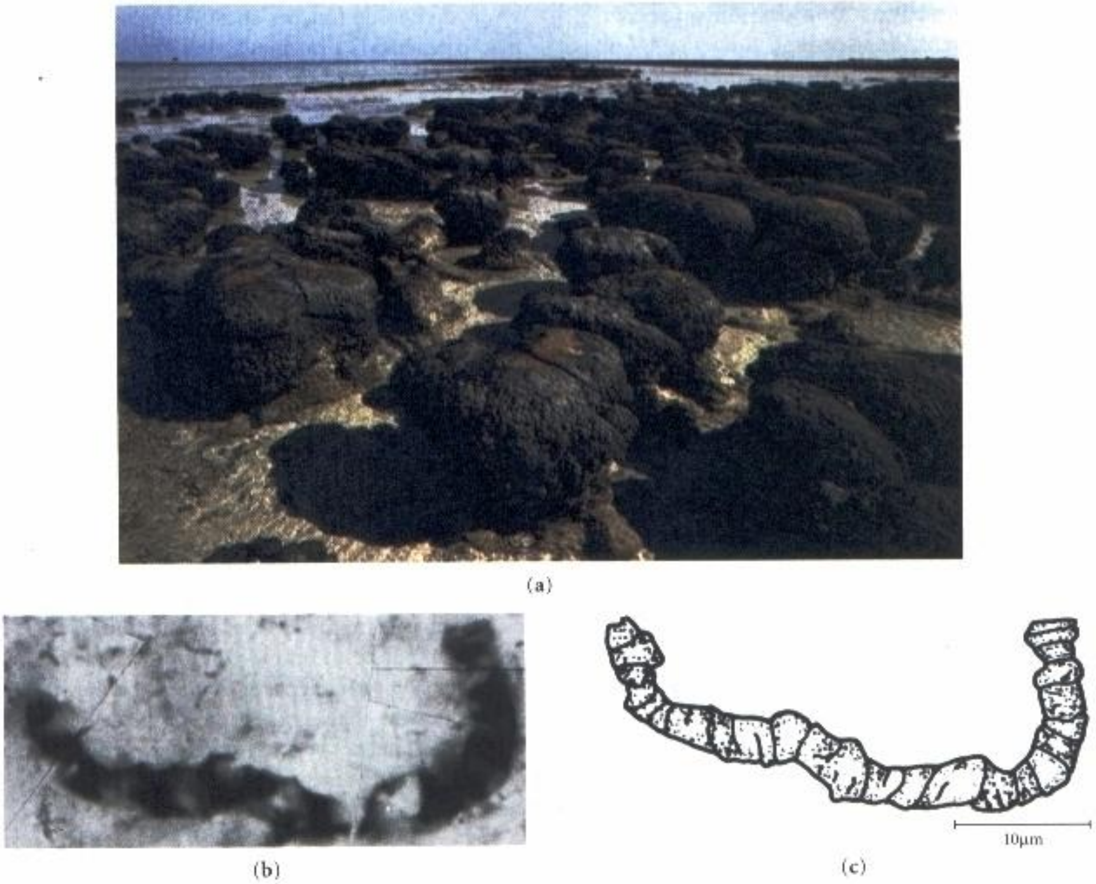
Figura 3-28 – Descrição de uma das possibilidades para o desenrolar do "drama da vida" segundo a hipótese do "mundo do RNA" e a transição deste (sombreado em amarelo) para o "mundo do DNA" (em alaranjado).

A divisão de funções entre DNA (armazenamento da informação genética) e proteínas (catálise) foi, de acordo com a hipótese do "mundo do RNA", um desenvolvimento posterior. Variantes novas e moléculas de RNA autoduplicadoras desenvolveram-se com a capacidade adicional de catalisar a condensação de aminoácidos em peptídeos. Ocasionalmente, o peptídeo (ou peptídeos), assim formado, reforçaria a capacidade autoduplicadora do RNA, e o par — molécula de RNA e peptídeo ajudante — pôde sofrer modificações posteriores, gerando sistemas replicadores ainda mais eficientes. Algum tempo depois da evolução desse sistema primitivo de síntese de proteína, ocorreu um desenvolvimento posterior: as moléculas de DNA com seqüências complementares ao RNA autoreplicador tomaram para si a função de conservar a informação genética e as moléculas do RNA evoluíram para desempenhar papéis na biossíntese de proteínas. As proteínas provaram ser catalisadores muito versáteis e com o tempo assumiram essa função. Compostos semelhantes a lipídios, na sopa primordial, formaram camadas relativamente impermeáveis que envolviam coleções de moléculas autoduplicadoras. A concentração de proteínas e ácidos nucléicos no interior desses envelopes lipídicos favoreceu as interações moleculares necessárias na autoduplicação.

Essa hipótese do "mundo do RNA" é plausível, mas de nenhuma forma universalmente aceita. Essa hipótese faz previsões que são verificáveis, e ela será testada e refinada na medida em que os testes experimentais se tornarem passíveis de ser realizados dentro de tempos relativamente curtos, quer dizer, tempos menores ou, pelo menos, iguais ao tempo de expectativa de vida de um cientista.

A evolução biológica começou há mais de três e meio bilhões de anos

Junto com o Sol e os demais planetas do nosso sistema, a Terra formou-se cerca de quatro e meio bilhões de anos atrás, e a primeira evidência definitiva de vida data de três e meio bilhões de anos atrás. Um grupo internacional de cientistas mostrou, em 1980, que certas formações rochosas muito antigas (estromatólitos; Fig. 3-29), que ocorrem na Austrália Ocidental, contêm fósseis de microrganismos primitivos. Em 1996, cientistas que trabalhavam na Groenlândia encontraram evidências químicas (não fósseis) da existência de vida há cerca de 4 bilhões de anos, formas de carbono incrustadas em rocha que aparentam ter uma origem biológica distinta. Em algum lugar da Terra, durante o primeiro período de um bilhão de anos, nasceu o primeiro organismo simples, capaz de reproduzir a sua própria estrutura a partir de um molde (RNA?) que foi o primeiro material genético. Devido à atmosfera terrestre, na aurora da vida, ser desprovida de oxigênio e já que havia poucos microrganismos para consumir os compostos orgânicos formados por processos naturais, esses compostos eram relativamente estáveis. Dados essa estabilidade e períodos de tempo muitíssimo longos, o improvável tornou-se inevitável: os compostos orgânicos foram incorporados em células para produzir mais e mais catalisadores efetivamente capazes de se auto-reproduzir. Assim começou o processo da evolução biológica. Os organismos desenvolveram mecanismos para atrelar a energia do Sol, por meio da fotossíntese, aos processos de síntese de açúcares e outras moléculas orgânicas a partir do CO_2 e converter o nitrogênio molecular da atmosfera em moléculas nitrogenadas, como os aminoácidos. Desenvolvendo suas próprias capacidades para a síntese de biomoléculas, as células tornaram-se independentes dos processos casuais pelos quais esses compostos primeiro apareceram na face da Terra. À medida que a evolução prosseguia, os organismos começaram a interagir e a tirar benefícios mútuos, formando sistemas ecológicos cada vez mais complexos.



(a)

(b)

(c)

Figura 3-29 – Recifes muito antigos da costa australiana contêm a evidência fóssil da vida microbiana nos mares de 3,5 bilhões de anos atrás. A contínua retenção de grânulos de areia e calcário pelo revestimento extracelular pegajoso de cianobactérias construiu, paulatinamente, esses estromatólitos encontrados em Hamelin Bay, na Austrália Ocidental (**a**). O exame microscópico de secções finas dos estromatólitos revela microfósseis de bactérias filamentosas (**b**). Estas são interpretadas como mostra o desenho (**c**).

Resumo

A maior parte do peso seco dos organismos vivos consiste de compostos orgânicos, moléculas que contêm esqueletos ou estruturas de átomos de carbono ligados covalentemente entre si, aos quais outros átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio podem ser ligados. Aos esqueletos carbônicos são ligados diferentes tipos de grupos funcionais, o que determina as propriedades químicas das moléculas orgânicas. As biomoléculas também têm formas características (configurações e conformações) em três dimensões. Muitas biomoléculas ocorrem em formas assimétricas, ou quirais, chamadas de enantiômeros e estereoisômeros, as quais são imagens especulares e que não se subrepõem umas às outras. Usualmente, apenas um dos enantiômeros do par tem atividade biológica.

As forças das ligações químicas covalentes, medidas em joules, dependem da eletronegatividade e do tamanho dos átomos que compartilham os elétrons. A variação da entalpia (ΔH) para uma reação química reflete o número e o tipo de ligações que são quebradas ou sintetizadas. Para as reações endotérmicas, ΔH é positivo, para as reações exotérmicas, negativo. As diferentes reações químicas que ocorrem no interior de uma célula pertencem a cinco categorias gerais: reações de oxidação-redução, quebra ou formação de ligações carbono-carbono, rearranjo de ligações ao redor de átomos de carbono, transferência de grupos e condensações.

A maior parte da matéria orgânica nas células vivas consiste em macromoléculas: ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos. Moléculas de lipídio, outro componente importante das células, são moléculas pequenas que formam grandes agregados. Cada tipo de macromolécula é composto de subunidades monoméricas pequenas unidas covalentemente e de relativamente poucos tipos. As proteínas são polímeros de 20 tipos diferentes de aminoácidos, os ácidos nucléicos são polímeros de unidades de nucleotídeos diferentes entre si (quatro no DNA e quatro no RNA) e os polissacarídeos são polímeros de unidades recorrentes de açúcares. Os ácidos nucléicos e as proteínas são macromoléculas informacionais; as seqüências características de suas subunidades constituem a individualidade genética de uma espécie. Os polissacarídeos simples funcionam como componentes estruturais, mas alguns polissacarídeos complexos também são macromoléculas informacionais, sua seqüência específica e estereoquímica permite que sejam reconhecidos por outras moléculas com alta especificidade.

Há uma hierarquia estrutural na organização molecular das células. As células contêm organelas tais como o núcleo, as mitocôndrias e os cloroplastos, os quais, por sua vez, contêm complexos supramoleculares como as membranas e os ribossomos, e estes consistem, por sua vez, de um grande número de macromoléculas que são mantidas unidas por forças não-covalentes relativamente fracas, porém numerosas. As macromoléculas consistem de subunidades unidas covalentemente. A formação de macromoléculas a partir de subunidades simples cria ordem ou organização (diminui a entropia); essa síntese requer energia e, portanto, precisa ser acoplada a reações exergônicas.

As biomoléculas pequenas, como os aminoácidos e os açúcares, apareceram, provavelmente, espontaneamente a partir de gases atmosféricos e da água sob a influência de energia elétrica (relâmpagos), durante a primitiva história da Terra. Esse processo chamado de evolução química pode ser simulado no laboratório. As subunidades monoméricas das macromoléculas celulares parecem ter sido selecionadas durante a evolução biológica. Essas moléculas que funcionam como subunidades são em número relativamente pequeno, mas elas são muito versáteis; a evolução combinou pequenas biomoléculas para produzir macromoléculas capazes de diferentes funções biológicas. As primeiras macromoléculas podem ter sido moléculas de RNA, que eram capazes de catalisar a sua própria replicação. Posteriormente, na evolução, o DNA assumiu a função de armazenar a informação genética, as proteínas tornaram-se os catalisadores celulares e o RNA o mediador entre o DNA e a proteína, permitindo a expressão da informação genética como proteínas.

Leitura Adicional

Geral

Frausto da Silva JJR & Williams RJP. (1994) *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, Claredon Press, Oxford.

Um texto excelente e de fácil entendimento sobre o papel dos elementos inorgânicos na bioquímica. Diagramas claros e referências boas.

Frieden E. (1972) The chemical elements of life. *Sci. Am.* **227** (July), 52-61.

The Molecules of Life. (1985) *Sci. Am.* **253** (October).

Todo um volume dedicado à estrutura e função das biomoléculas. Inclui artigos sobre o DNA, o RNA, proteínas e suas subunidades.

Química e estereoquímica

Barta NS & Stille JR. (1994) Grasping the concepts of stereochemistry. *J. Chem. Educ.* **71**, 20-23.

Uma descrição clara do sistema RS para nomear os estereoisômeros, com sugestões práticas para determinar e relembrar o "lado preferencial" (esquerdo ou direito) de isômeros.

Brewster JH. (1986) Stereochemistry and the origins of life. *J. Chem. Educ.* **63**, 667-670.

Uma discussão lúcida e interessante dos caminhos pelos quais a evolução selecionou apenas um dos dois estereoisômeros para a construção de proteínas e outras moléculas.

Hegstrom RA & Kondepudi DK. (1990) The handedness of the universe. *Sci. Am.* **262** (January), 108-115.

Estereoquímica e assimetria das biomoléculas vistas no contexto do Universo.

Kotz JC & Treichel P Jr. (1998) *Chemistry and Chemical Reactivity*, Saunders College Publishing, Fort Worth, TX.

Uma introdução excelente e ampla sobre a química.

Loudon M. (1995) *Organic Chemistry*, 3rd edn, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.

Este e os dois livros a seguir fornecem detalhes sobre a estereoquímica e a reatividade química dos grupos funcionais. Todos eles são excelentes livros-texto.

Morrison RT & Boyd RN. (1999) *Organic Chemistry*, 7th edn, Allyn & Bacon, Inc., Boston, MA.

Streitwieser A Jr, Heathcock CH & Kosower EM. (1998) *Introduction to Organic Chemistry*, 4th edn, revised printing, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.

Wagner G. (1997) An account of NMR in structural biology, *Nature Struct. Biol.*, NMR Suppl. (October), 841-844.

Uma avaliação clara e concisa do desenvolvimento do NMR como uma ferramenta bioquímica, aplicações correntes e perspectivas futuras.

Evolução pré-biótica

Cavalier-Smith T. (1987) The origin of cells: a symbiosis between genes, catalysts, and membranes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 805-824.

Darnell JE & Doolittle WF. (1986) Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1271-1275.

Uma descrição clara do "mundo do RNA" e suas possibilidades.

de Duve C. (1995) The beginnings of life on earth. *Am. Sci.* **83**, 428-437.

Um cenário para a sucessão das etapas químicas que levaram ao primeiro organismo vivo.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**.

Uma coleção de quase cem artigos sobre todos os aspectos da evolução pré-biótica e do início da evolução biológica; provavelmente a melhor fonte singular sobre a evolução molecular.

Ferris JP. (1984) The chemistry of the life's origin. *Chem. Eng. News* **62**, 21-35.

Uma descrição clara e concisa das evidências experimentais da síntese de biomoléculas em condições pré-bióticas.

Gesteland RF & Atkins JF (eds). (1993) *The RNA World*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Uma coleção de revisões estimulantes sobre uma variedade de tópicos relacionados ao cenário do mundo do RNA.

Hager AJ, Pollard JD & Szostak JW. (1996) Ribozymes: aiming at RNA replication and protein synthesis. *Chem. Biol.* **3**, 717-725.

Uma revisão concisa dos estudos sobre o RNA como o catalisador da síntese de RNA e da síntese da ligação amida e a relevância desses achados para o cenário do mundo do RNA.

Hirao I & Ellington AD. (1995) Re-creating the RNA world. *Curr. Biol.* **5**, 1017-1022.

Este e o artigo de Robertson e Ellington (1997), citado adiante, descrevem uma pesquisa que objetiva a reprodução no laboratório da origem evolucionária do RNA catalítico.

Horgan J. (1991) In the beginning... *Sci. Am.* **264** (February), 116-125.

Uma exposição clara e concisa das teorias atuais a respeito da evolução pré-biótica.

Lazcano A & Miller SL. (1996) The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell.* **85**, 793-798.

Revisão breve de desenvolvimentos recentes sobre estudos da origem da vida: atmosferas primitivas, ventos submarinos, origem autotrófica *versus* heterotrófica, mundo do RNA e pré-RNA e o tempo necessário para surgir a vida.

Miller SL. (1987) Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 17-27.

Sumário dos experimentos de laboratório sobre evolução química pelo indivíduo que fez o experimento original de Miller-Urey.

Miller SL & Orgel LE. (1974) *The Origins of Life on the Earth*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ. The New Age of RNA. (1993) *FASEB J.* 7 (1).

Uma coleção de aproximadamente 15 artigos concisos relacionados ao cenário do "mundo do RNA".

Robertson MP & Ellington AD. (1997) Ribozymes: red in tooth and claw. *Curr. Biol.* 7, R376-R379.

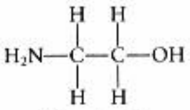
Schopf JW (ed). (1983) *Earth's Earliest Biosphere*, Princeton University Press, Princeton, NJ.

Uma discussão abrangente da história geológica e sua relação com o desenvolvimento da vida.

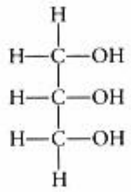
Problemas

1. Vitamina C: a vitamina sintética é tão boa quanto a natural? Os naturalistas alegam vigorosamente que as vitaminas obtidas de fontes naturais são mais saudáveis do que aquelas obtidas por síntese química. Por exemplo, alega-se que o ácido L-ascórbico (vitamina C) obtido de algumas frutas é melhor para você do que o ácido L-ascórbico puro sintetizado em laboratórios químicos. As vitaminas das duas fontes são realmente diferentes? O organismo pode distinguir a fonte ou a origem de uma vitamina?

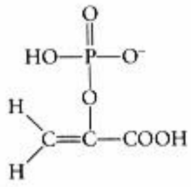
2. Identificação de grupos funcionais. As Figuras 3-5 e 3-6 mostram os grupos funcionais comuns das biomoléculas. Como as propriedades e as atividades biológicas das biomoléculas são largamente determinadas por seus grupos funcionais, é importante ser capaz de reconhecê-los. Identifique e denomine cada um dos grupos funcionais presentes nas moléculas apresentadas abaixo.



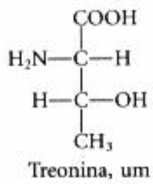
Etanolamina
(a)



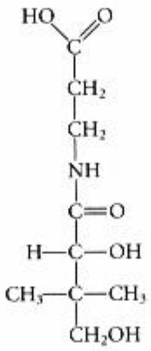
Glicerol
(b)



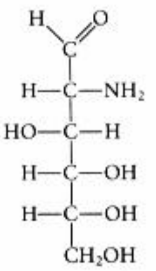
Ácido fosfoenolpirúvico, um intermediário no metabolismo da glicose
(c)



Treonina, um aminoácido
(d)



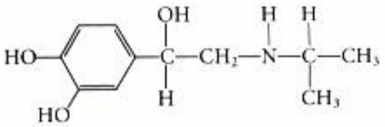
Ácido pantotênico, uma vitamina
(e)



D-glicosamina
(f)

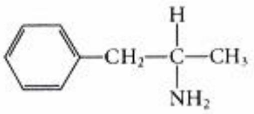
Problema 2

3. Estereoquímica e atividade farmacológica de uma droga. As diferenças quantitativas na atividade biológica exibida por dois enantiômeros são, às vezes, muito grandes. Por exemplo, o isômero D da droga isoproterenol (usada no tratamento da asma leve ou moderada) é de 50 a 80 vezes mais efetivo como broncodilatador do que o isômero L. Identifique o centro quiral do isoproterenol. Por que os dois enantiômeros têm bioatividade tão radicalmente diferente?



Isoproterenol

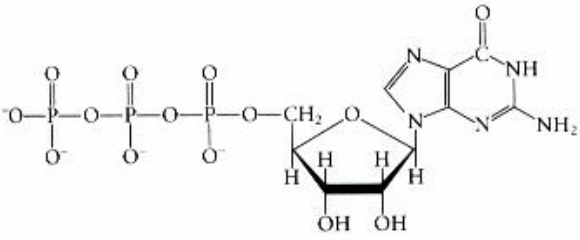
4. Forma das moléculas e ação farmacológica de drogas. Alguns anos atrás duas companhias farmacêuticas comercializaram um remédio sob os nomes de Dexedrina e Benzedrina. A estrutura da droga é mostrada abaixo.



As propriedades físicas e químicas (elementos constitutivos como C, H, N, ponto de fusão, solubilidade etc.) de ambas eram idênticas. A dosagem por via oral recomendada da Dexedrina (a qual ainda está à venda) era 5mg por dia, mas a dosagem recomendada da Benzedrina era significativamente mais alta. Aparentemente, para um mesmo efeito, era necessária uma dose muito menor de Dexedrina. Explique essa contradição.

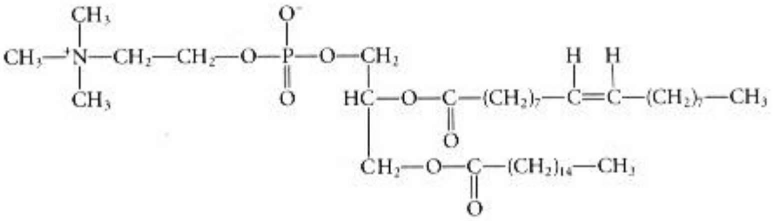
5. Componentes de biomoléculas complexas. A Figura 3-24 mostra os principais componentes das biomoléculas complexas. Identifique os constituintes de cada uma das três biomoléculas importantes mostradas abaixo em suas formas iônicas predominantes em valores de pH fisiológico.

(a) Trifosfato de guanosina (GTP), um nucleotídeo rico em energia que serve como precursor do RNA:

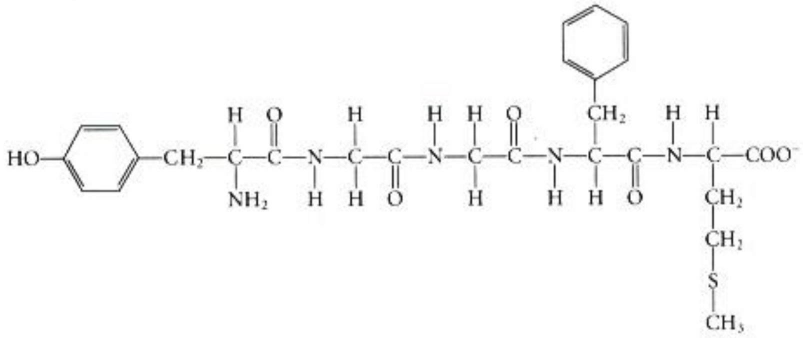


Problema 5

(b) Fosfatidilcolina, um componente de muitas membranas celulares:



(c) Metionina-encefalina, o opióide produzido pelo cérebro:



6. Determinação da estrutura de uma biomolécula. Uma substância desconhecida X foi isolada do músculo de coelho. A estrutura de X foi determinada a partir das experiências e observações descritas a seguir. A análise qualitativa mostrou que X era composto inteiramente de carbono, hidrogênio e oxigênio. Uma amostra de X de massa conhecida foi completamente oxidada e medidas as quantidades de água e dióxido de carbono produzidas. A partir dessa análise quantitativa, concluiu-se que X continha 40,00% de C, 6,71% de H e 53,29% de O, por peso. O peso molecular de X foi determinado por meio de um espectrômetro de massa, resultando em 90,00. Um espectro infravermelho de X mostrou que ele continha uma dupla ligação. A substância X era consideravelmente solúvel em água e dava uma solução ácida. Uma solução de X foi testada em um polarímetro e demonstrou possuir atividade óptica.

(a) Determine as fórmulas empírica e molecular de X.

(b) Desenhe as possíveis estruturas de X que satisfaçam a fórmula molecular e contenham uma dupla ligação. Considere *apenas* estruturas lineares ou ramificadas e não considere estruturas cíclicas. Note que o oxigênio forma consigo mesmo ligações muito fracas.

(c) Qual é o significado estrutural da atividade óptica observada? Que estruturas no item (b) são eliminadas por essa observação? Que estruturas são compatíveis com ela?

(d) Qual é o significado estrutural da observação de que a solução de X era ácida? Que estruturas em (b) podem ser eliminadas agora? Que estruturas são compatíveis com essa observação?

(e) Qual é a estrutura de X? Existe mais de uma estrutura compatível com todos os dados experimentais?

7. Separação de biomoléculas. No laboratório de bioquímica primeiramente é necessário separar a molécula de interesse de outras biomoléculas presentes em uma amostra — isto é, purificar proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos ou lipídios. Técnicas de purificação serão tratadas posteriormente no texto do livro. Porém, somente pela observação das subunidades monoméricas das quais as biomoléculas grandes são formadas, você deve imaginar quais características dessas biomoléculas permitem separá-las umas das outras.

(a) Quais características do aminoácido e do ácido graxo permitiriam separá-los facilmente um do outro?

(b) Como os nucleotídeos devem ser separados das moléculas de glicose?

8. Vida baseada em silício? Silício é um elemento químico do mesmo grupo da tabela periódica que o carbono e, como ele, é capaz de formar quatro ligações simples. Muitas histórias de ficção científica foram descritas e fundamentadas na premissa da vida ser baseada em silício: isso é real? Quais as características do silício que o fazem menos adaptado para ser o elemento organizacional central para a vida? Para responder esta questão, use a informação deste capítulo sobre a versatilidade da ligação do carbono e referência sobre o livro-texto que trata do início da química inorgânica para as propriedades da ligação do silício.

CAPÍTULO 4

Água

A água é a substância mais abundante nos sistemas vivos, perfazendo 70% ou mais da massa da maioria dos organismos. Os primeiros organismos vivos provavelmente apareceram em um ambiente aquoso, e a evolução foi marcada pelas propriedades do meio aquoso onde a vida começou.

Este capítulo começa com a descrição das propriedades físicas e químicas da água em relação às quais todos os aspectos da estrutura e função da célula estão adaptados. As forças de atração entre as moléculas da água e a pequena tendência da água em se ionizar são de importância crucial para a estrutura e função das biomoléculas. Nós reveremos o tópico da ionização em termos de constantes de equilíbrio, pH e curvas de titulação e consideraremos como as soluções aquosas de ácidos ou bases fracas e seus sais funcionam como tampões contra as variações de pH nos sistemas biológicos. A molécula de água e seus produtos de ionização, H^+ e OH^-, influenciam profundamente a estrutura, a automontagem e as propriedades de todos os componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucléicos e lipídios. As interações não-covalentes, responsáveis pela força e especificidade do reconhecimento entre as biomoléculas, são influenciadas decisivamente pelas propriedades solventes da água.

Vista do espaço interplanetário; a Terra mostra que a maior parte de sua superfície é coberta de água. Os mares, onde provavelmente a vida surgiu, são atualmente o habitat de incontáveis organismos.

Interações Fracas em Sistemas Aquosos

As pontes de hidrogênio entre as moléculas de água fornecem as forças coesivas, as quais tornam a água um líquido à temperatura ambiente e favorecem um rígido ordenamento das moléculas que é típico da água cristalizada (gelo). As biomoléculas polares dissolvem-se facilmente na água porque podem substituir as interações água-água por interações água-soluto, mais favoráveis energeticamente. Diferentemente, as biomoléculas não-polares interferem com as interações água-água, mas são incapazes de formar interações água-soluto — conseqüentemente moléculas não-polares são pouco solúveis em água. Em solução aquosa, moléculas não-polares tendem a se agregar.

As pontes de hidrogênio, as interações iônicas, as interações hidrofóbicas (do grego, "que teme a água") e as interações de van der Waals são individualmente fracas, mas coletivamente têm uma influência muito significativa na estrutura tridimensional de proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e lipídios de membranas.

As pontes de hidrogênio conferem à água suas propriedades incomuns

A água tem ponto de fusão, ponto de ebulição e calor de vaporização maiores que os da maioria de outros solventes comuns (Tabela 4-1). Essas propriedades incomuns da água são uma conseqüência das atrações entre moléculas de água adjacentes que dão à água líquida uma grande coesão interna. A observação da estrutura eletrônica da água revela a causa dessas atrações intermoleculares.

Tabela 4-1 – Temperaturas de fusão, ebulição e calor de vaporização de alguns solventes comuns

	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Calor de vaporização (J/g)*
Água	0	100	2.260
Metanol (CH_3OH)	–98	65	1.100
Etanol (CH_3CH_2OH)	–117	78	854
Propanol ($CH_3CH_2CH_2OH$)	–127	97	687
Butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$)	–90	117	590
Acetona (CH_3COCH_3)	–95	56	523
Hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$)	–98	69	423
Benzeno (C_6H_6)	6	80	394
Butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$)	–135	–0,5	381
Clorofórmio ($CHCl_3$)	–63	61	247

* Energia calorífica necessária para converter em vapor 1,0g do líquido, estando ambos na sua temperatura de ebulição e sob pressão atmosférica normal. O calor de vaporização é uma medida direta da energia necessária para romper as forças de atração entre as moléculas na fase líquida.

Cada átomo de hidrogênio da molécula de água compartilha um par de elétrons com o átomo de oxigênio. A geometria da molécula de água é determinada pelas formas dos orbitais eletrônicos externos do átomo de oxigênio, que são similares aos orbitais de ligação do átomo de carbono (veja Fig. 3-4a). Esses orbitais descrevem grosseiramente um tetraedro, com um átomo de hidrogênio em dois dos ângulos e elétrons desempa-

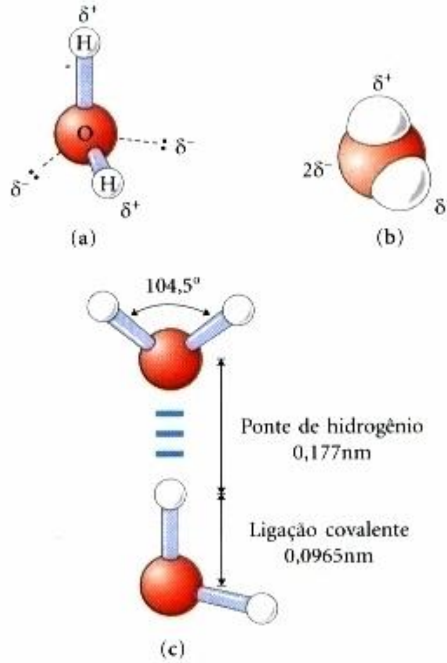


Figura 4-1 – Estrutura da molécula da água. A natureza dipolar da molécula de água é mostrada pelos modelos (**a**) bola-e-bastão e (**b**) espaço-cheio. As linhas pontilhadas em (**a**) representam os orbitais que não formam ligações. Existe um arranjo quase tetraédrico dos elétrons da camada mais externa ao redor do átomo de oxigênio; os dois átomos de hidrogênio apresentam cargas elétricas parciais positivas localizadas (δ^+), e o átomo de oxigênio, uma carga parcial negativa ($2\delta^-$). (**c**) Duas moléculas de H_2O unidas por uma ponte de hidrogênio (designada por três linhas azuis) entre o átomo de oxigênio da molécula que está acima e o átomo de hidrogênio da molécula que está abaixo. As pontes de hidrogênio são mais longas e mais fracas que as ligações covalentes O—H.

relhados nos outros dois ângulos (Fig. 4-1). O ângulo da ligação H—O—H é 104,5°, um pouco menor que os 109,5° de um tetraedro perfeito, devido à compressão causada pelos orbitais não-ligantes do átomo de oxigênio.

O núcleo do oxigênio atrai elétrons de maneira mais forte que o núcleo do hidrogênio (próton); o oxigênio é mais eletronegativo (veja Tabela 3-2). Portanto, o compartilhamento dos elétrons entre H e O é desigual; os elétrons permanecem, com mais freqüência, nas vizinhanças do átomo de oxigênio do que nas do átomo de hidrogênio. O resultado desse compartilhamento desigual dos elétrons são dois dipolos elétricos na molécula de água, um ao longo de cada uma das ligações H—O; o átomo de oxigênio possui uma carga elétrica negativa parcial ($2\delta^-$), e cada hidrogênio, uma carga parcial positiva (δ^+). Como resultado, existe uma atração eletrostática entre o átomo de oxigênio de uma molécula de água e o átomo de hidrogênio de uma outra molécula (Fig. 4-1c), denominada **ponte de hidrogênio**. Ao longo deste livro, representaremos as pontes de hidrogênio com três linhas azuis paralelas como na Figura 4-1c.

As pontes de hidrogênio são mais fracas que as ligações covalentes. As pontes de hidrogênio na água líquida têm uma **energia de dissociação de ligação** (energia necessária para romper a ligação) da ordem de 20kJ/mol, comparada com 348kJ/mol para a ligação covalente C—C. À temperatura ambiente, a energia térmica de uma solução aquosa (energia cinética resultante do movimento dos átomos e moléculas individuais) é da mesma ordem de grandeza que a da requerida para quebrar as pontes de hidrogênio. Quando a água é aquecida, o aumento da sua temperatura acarreta um movimento mais rápido das suas moléculas individuais. Embora, em qualquer instante, a maioria das moléculas da água líquida esteja ligada por pontes de hidrogênio, o tempo de vida de cada ponte de hidrogênio é menor que 1×10^{-9}s. O termo "aglomerados oscilantes" é apropriado para designar grupos de vida curta de moléculas ligadas entre si por pontes de hidrogênio na água líquida. A soma de todas as pontes de hidrogênio acarreta uma grande coesão interna à água líquida.

O arranjo quase tetraédrico dos orbitais ao redor do átomo de oxigênio (Fig. 4-1a) permite a cada molécula de água formar pontes de hidrogênio com até quatro outras moléculas de água vizinhas. Entretanto, na água líquida, à temperatura e à pressão atmosférica ambientes, as moléculas de água estão desorganizadas e em contínuo movimento, de modo que cada molécula forma pontes de hidrogênio com cerca de outras 3,4 moléculas. No gelo, por outro lado, cada molécula de água está fixa em um determinado espaço e forma pontes de hidrogênio com outras quatro moléculas de água originando uma rede regular (Fig. 4-2). O rompimento de certo número de pontes de hidrogênio suficiente para desestabilizar a rede cristalina requer uma grande quantidade de energia térmica, o que contribui para o ponto de fusão relativamente alto da água (Tabela 4-1). Quando o gelo se funde ou a água se evapora, o calor é absorvido pelo sistema:

$$H_2O(s) \longrightarrow H_2O(l) \quad \Delta H = +5{,}9\text{kJ/mol}$$

$$H_2O(l) \longrightarrow H_2O(g) \quad \Delta H = +44{,}0\text{kJ/mol}$$

Durante a fusão ou a evaporação, a entropia do sistema aquoso aumenta à medida que os arranjos altamente ordenados de moléculas de água se relaxam em arranjos menos ordenados de pontes de hidrogênio na água líquida, ou na total desorganização do estado gasoso. À temperatura ambiente, tanto a fusão do gelo como a evaporação da água ocorrem espontaneamente; a tendência de as moléculas de água se associarem por meio de pontes de hidrogênio é compensada pelo impulso

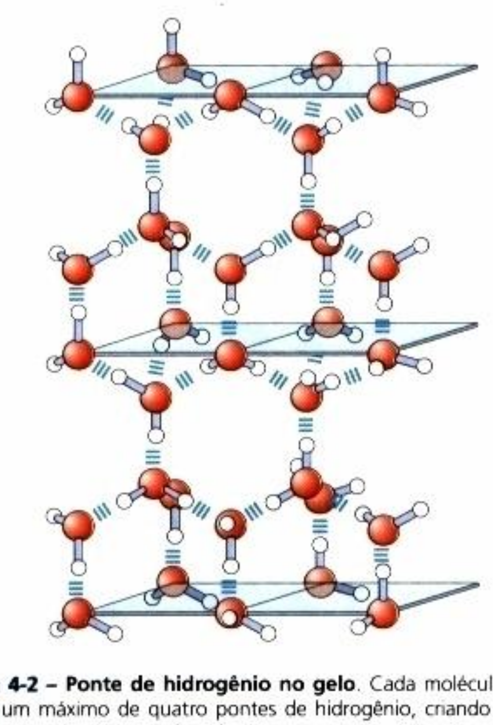


Figura 4-2 – Ponte de hidrogênio no gelo. Cada molécula de água forma um máximo de quatro pontes de hidrogênio, criando uma rede cristalina regular. Na água líquida, à temperatura e à pressão atmosférica ambientes, contrastantemente, cada molécula de água forma em média 3,4 pontes de hidrogênio com outras moléculas de água. A rede cristalina do gelo ocupa mais espaço que o mesmo número de moléculas de H_2O ocupa na água líquida; assim, o gelo é menos denso que a água líquida e, portanto, nela flutua.

energético em direção à desordem. Lembre-se de que a variação de energia livre (ΔG) deve ter um valor negativo para um processo ocorrer espontaneamente: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, onde ΔG representa a força propulsora; ΔH a mudança da entalpia para fazer e romper ligações; e ΔS o aumento da desordem. Uma vez que ΔH é positivo para a fusão e a evaporação, fica evidente que é o aumento na entropia (ΔS) que torna ΔG negativo e propicia essas transformações.

A água forma pontes de hidrogênio com os solutos polares

As pontes de hidrogênio não são restritas à água. Elas se formam facilmente entre um átomo eletronegativo (o aceptor de hidrogênio, usualmente oxigênio ou nitrogênio, com um par de elétrons livre) e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo (doador de elétrons), na mesma ou em outra molécula (Fig. 4-3). Os átomos de hidrogênio ligados covalentemente a átomos de carbono (que não são eletronegativos) não participam das pontes de hidrogênio. Essa diferença explica por que o butanol ($CH_2CH_2CH_2CH_2OH$) tem um ponto de ebulição relativamente alto, de 117°C, enquanto o butano ($CH_3CH_2CH_2CH_3$) tem um ponto de ebulição de apenas –0,5°C. O butanol tem um grupo hidroxila polar e, assim, pode formar pontes de hidrogênio intermolecular.

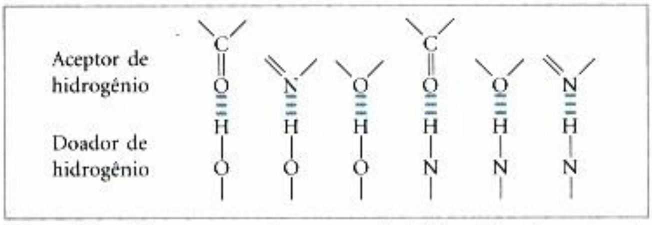


Figura 4-3 – Tipos comuns de pontes de hidrogênio. O aceptor de hidrogênio geralmente é o oxigênio ou o nitrogênio.

As biomoléculas polares porém não-carregadas, como os açúcares, dissolvem-se facilmente na água devido ao efeito estabilizador das pontes de hidrogênio que se formam entre os grupos hidroxila ou o oxigênio do grupo carbonila do açúcar e as moléculas polares da água. Os álcoois, aldeídos, cetonas e compostos que apresentam ligações N—H formam pontes de hidrogênio com moléculas de água (Fig. 4-4) e tendem a ser solúveis na água.

As pontes de hidrogênio são mais fortes quando as moléculas por elas unidas estão orientadas de forma a maximizar a interação eletrostática, o que ocorre quando o átomo de hidrogênio e os dois átomos que o compartilham estão localizados em uma mesma linha reta, isto é, quando o átomo aceptor está alinhado com a ligação covalente entre o átomo doador e o H (Fig. 4-5). Assim, as pontes de hidrogênio são altamente direcionais e capazes de manter duas moléculas ou grupos unidos por pontes de hidrogênio em um arranjo geométrico específico. Como veremos mais adiante, essa propriedade das pontes de hidrogênio acarreta estruturas tridimensionais muito precisas às moléculas de proteínas e ácidos nucléicos, que apresentam um grande número de pontes de hidrogênio intramoleculares.

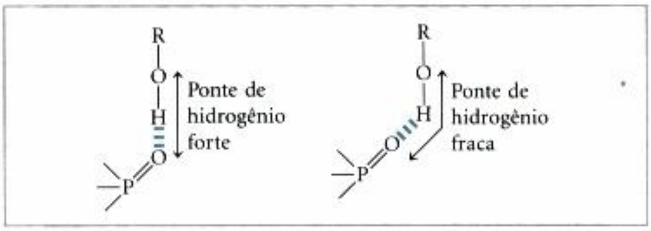


Figura 4-5 – Orientação das pontes de hidrogênio. A atração entre as cargas elétricas parciais (veja Fig. 4-1) é maior quando os três átomos envolvidos (neste caso O, H e O) estão alinhados. Quando as metades ligadas pela ponte de hidrogênio estão estruturalmente restritas (como, por exemplo, quando elas são partes de uma simples molécula de proteína), essa geometria ideal pode não ocorrer e a ponte de hidrogênio resultante é mais fraca.

A água interage eletrostaticamente com os solutos que exibem carga elétrica

A água é um solvente polar. Ela dissolve facilmente a maioria das biomoléculas, que geralmente são compostos carregados eletricamente ou polares (Tabela 4-2); compostos que se dissolvem facilmente na água são **hidrofílicos** (do grego "que gosta da água"). Em contraste, solventes não-polares tais como o clorofórmio e o benzeno são muito pobres para as biomoléculas polares, mas dissolvem facilmente aquelas que são **hidrofóbicas** — moléculas não-polares como os lipídios e as ceras.

A água dissolve sais como o NaCl hidratando e estabilizando os íons Na^+ e Cl^-, enfraquecendo as **interações eletrostáticas** entre eles e assim contrapondo-se à tendência de se associarem em uma rede cristalina (Fig. 4-6). Os mesmos fatores são aplicáveis às biomoléculas carregadas eletricamente, compostos

Figura 4-4 – Algumas pontes de hidrogênio de importância biológica.

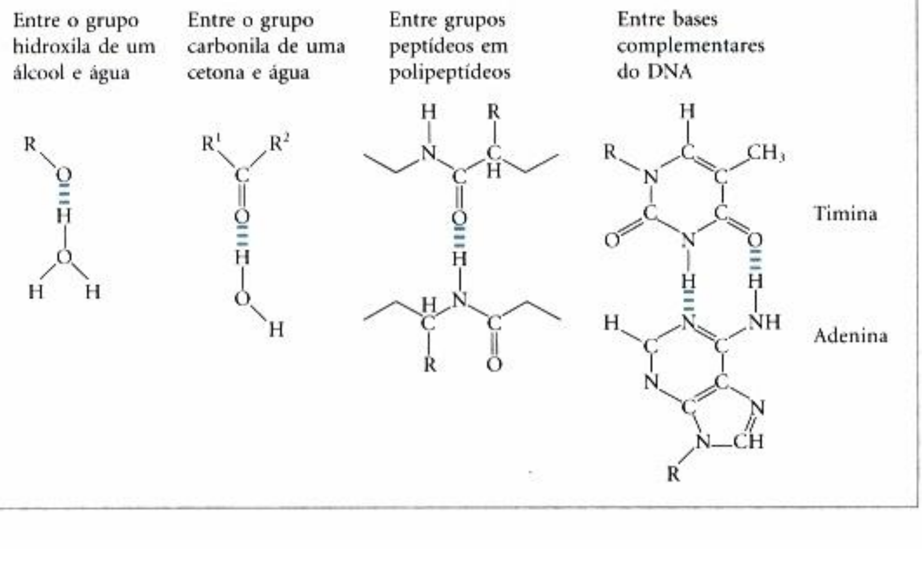

Entre o grupo hidroxila de um álcool e água
Entre o grupo carbonila de uma cetona e água
Entre grupos peptídeos em polipeptídeos
Entre bases complementares do DNA
Timina
Adenina

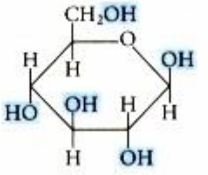
Tabela 4-2 – **Alguns exemplos de biomoléculas polares, não-polares e anfipáticas (mostradas como formas iônicas em pH 7)**

🟦 Grupos polares

🟨 Grupos não-polares

Polar

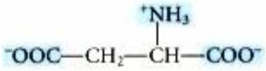
Glicose



Glicina

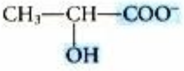
$^{+}NH_3—CH_2—COO^{-}$

Aspartato



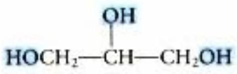
$^{-}OOC—CH_2—\overset{\overset{\textstyle ^{+}NH_3}{|}}{C}H—COO^{-}$

Lactato



$CH_3—\underset{\underset{\textstyle OH}{|}}{C}H—COO^{-}$

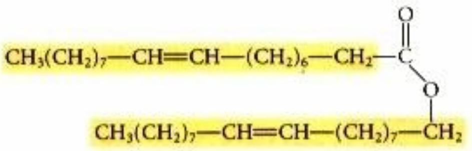
Glicerol



$HOCH_2—\overset{\overset{\textstyle OH}{|}}{C}H—CH_2OH$

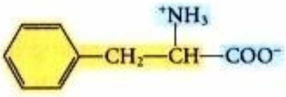
Não-polar

Cera típica

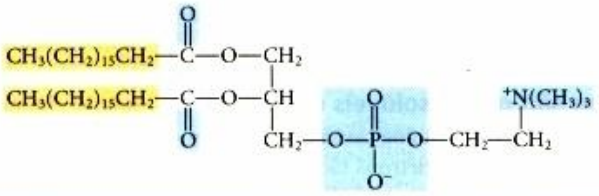


Anfipática

Fenilalanina



Fosfatidilcolina



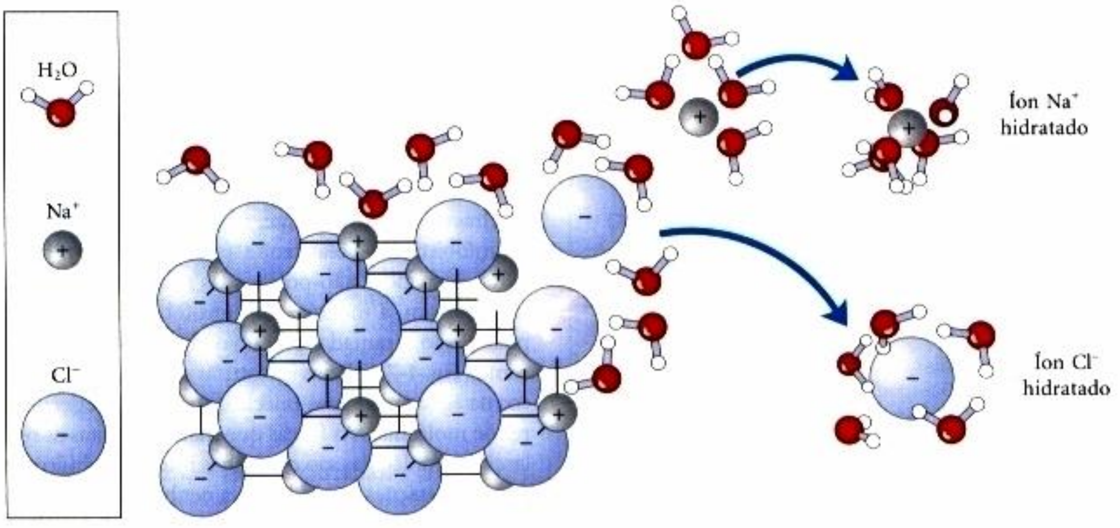


Figura 4-6 – A água dissolve muitos sais cristalinos por meio da hidratação dos íons que os constituem. A rede cristalina do NaCl é rompida à medida que as moléculas de H_2O se agregam ao redor dos íons Cl^- e Na^+. As cargas iônicas são neutralizadas parcialmente, e a atração eletrostática necessária para a formação da rede é enfraquecida.

com grupos funcionais tais como ácidos carboxílicos ionizados (—COO^-), aminas protonadas (—NH_3^+), ésteres ou anidridos fosfóricos. A água dissolve facilmente esses compostos substituindo as pontes de hidrogênio soluto-soluto por pontes de hidrogênio soluto-água, atenuando as interações eletrostáticas entre as moléculas do soluto.

A água é especialmente efetiva em atenuar as interações eletrostáticas entre os íons dissolvidos, devido à sua alta constante dielétrica, uma propriedade física que reflete o número de dipolos em um solvente. A intensidade ou força (F) das interações iônicas em uma solução depende da magnitude das cargas (Q), da distância entre os grupos carregados (r) e da constante dielétrica (ε) do solvente em que ocorre a interação:

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\varepsilon r^2}$$

Para a água a 25°C, ε (que não tem dimensões) é 78,5, e para o solvente orgânico apolar benzeno, ε é 4,6. Assim, as interações iônicas são muito mais fortes em ambientes de baixa polaridade. A dependência de fator r^2 é tal que as atrações ou as repulsões iônicas operam somente a curtas distâncias — no intervalo de 10 a 40nm (dependendo da concentração total de eletrólitos), quando o solvente é a água.

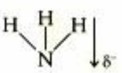
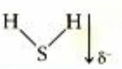
A entropia aumenta quando substâncias cristalinas são dissolvidas

À medida que um sal como o NaCl se dissolve, os íons Na^+ e Cl^-, ao deixarem a rede cristalina, adquirem maior grau de liberdade de movimento (Fig. 4-6). O conseqüente aumento na entropia (desordem) do sistema é o grande responsável pela facilidade de dissolução de sais, como o NaCl na água. Em termos termodinâmicos, a formação da solução ocorre com uma mudança favorável na energia livre: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, onde ΔH tem um valor positivo pequeno, e $T\,\Delta S$, um valor positivo grande; assim, ΔG é negativo.

Os gases não-polares são pouco solúveis em água

As moléculas dos gases CO_2, O_2 e N_2, biologicamente importantes, são não-polares. No O_2 e no N_2, os elétrons são compartilhados igualmente pelos dois átomos. No CO_2, cada ligação C=O é polar, mas os dois dipolos estão direcionados de forma oposta e se cancelam mutuamente (Tabela 4-3). A passagem dessas moléculas da fase gasosa desordenada para a solução aquosa restringe seus movimentos e o movimento das moléculas da água; portanto, representa uma diminuição na entropia. A natureza não-polar desses gases e a diminuição na entropia quando eles passam para a solução é uma combinação que os torna pouco solúveis em água (Tabela 4-3). Alguns organismos apresentam proteínas carregadoras solúveis na água (hemoglobina e mioglobina, por exemplo) que facilitam o transporte do O_2. Em solução aquosa, o dióxido de carbono forma o ácido carbônico (H_2CO_3) e é transportado como HCO_3^- na forma livre — bicarbonato é muito solúvel em água (~ 100g/L, a 25°C) — ou ligado à hemoglobina.

Tabela 4-3 – Solubilidade de alguns gases em água

Gás	Estrutura*	Polaridade	Solubilidade em água (g/L)[†]
Nitrogênio	N≡N	Não-polar	0,018 (40°C)
Oxigênio	O=O	Não-polar	0,035 (50°C)
Dióxido de carbono	$\overset{\overset{\delta^-}{\longleftarrow}\quad\overset{\delta^-}{\longrightarrow}}{O{=}C{=}O}$	Não-polar	0,97 (45°C)
Amônia		Polar	900 (10°C)
Sulfeto de hidrogênio		Polar	1.860 (40°C)

*As setas representam dipolos elétricos; existe uma carga parcial negativa (δ^-) na ponta da seta e uma carga positiva parcial (δ^+, não exibida aqui) na extremidade oposta.

[†] Note que as moléculas polares se dissolvem muito melhor, mesmo a baixas temperaturas, que as moléculas não-polares, a temperaturas relativamente mais elevadas.

Dois outros gases, NH_3 e H_2S, também têm funções biológicas em alguns organismos. Esses gases são polares e se dissolvem facilmente na água.

Compostos não-polares forçam mudanças energeticamente desfavoráveis na estrutura da água

Quando a água é misturada com benzeno ou hexano, formam-se duas fases: nenhum líquido é solúvel no outro. Compostos não-polares como benzeno e hexano são **hidrofóbicos** — eles são incapazes de interagir de forma energeticamente favorável com as moléculas da água e interferem com as pontes de hidrogênio entre as moléculas de água. Todas as moléculas ou íons dissolvidos na água interferem com as pontes de hidrogênio de algumas moléculas de água que estão na sua vizinhança imediata, mas solutos polares ou carregados (como NaCl) compensam a perda de pontes de hidrogênio água-água, formando novas interações água-soluto. A variação da entalpia (ΔH) para dissolver esses solutos é geralmente pequena. Solutos hidrofóbicos, entretanto, não oferecem essa compensação e a sua adição à água pode, portanto, resultar em um pequeno ganho de entalpia; a quebra de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água retira energia do sistema. Além disso, a dissolução de compostos hidrofóbicos na água resulta em uma diminuição mensurável na entropia. As moléculas de água nas vizinhanças imediatas de um soluto não-polar apresentam uma restrição em relação às suas possíveis orientações, à medida que formam um arcabouço semelhante a uma gaiola, altamente organizado, ao redor de cada molécula de soluto. Essas moléculas de água não são altamente organizadas como aquelas nos compostos cristalinos de um soluto não-polar e água (**clatrato**), mas o efeito é o mesmo em ambos os casos: a organização das moléculas da água diminui a entropia. O número de moléculas de água organizadas, por conseguinte a diminuição da entropia, é proporcional à área da superfície do soluto hidrofóbico preso dentro da gaiola de moléculas de água. Assim, a variação da energia livre para dissolver um soluto não-polar na água é desfavorável: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, onde ΔH tem um valor positivo, ΔS, um valor negativo, e ΔG é positivo.

Compostos **anfipáticos** têm regiões polares (ou carregadas) e regiões não-polares (Tabela 4-2). Quando um composto anfipático é misturado com água, a região hidrofílica polar interage favoravelmente com o solvente, que tende a se dissolver; mas a região hidrofóbica não-polar tende a evitar o contato com a água (Fig. 4-7a). As regiões não-polares das moléculas se agregam, apresentando, assim, a menor área hidrofóbica ao solvente, e as regiões polares são arranjadas para maximizar a sua interação com o solvente (Fig. 4-7b). Essas estruturas estáveis de compostos anfipáticos na água, chamadas **micelas**, podem conter centenas ou milhares de moléculas. As forças que mantêm juntas as regiões não-polares das moléculas são chamadas **interações hidrofóbicas**. A força dessas interações não é devida a nenhuma atração intrínseca entre as moléculas não-polares. Ao contrário, ela resulta do fato de o sistema atingir a maior estabilidade termodinâmica, minimizando o número de moléculas de água ordenadas, requeridas para envolver as regiões hidrofóbicas das moléculas do soluto.

Muitas biomoléculas são anfipáticas: proteínas, pigmentos, algumas vitaminas, esteróides e fosfolipídios de membranas têm regiões superficiais polares e não-polares. As estruturas que compõem essas moléculas são estabilizadas por interações hidrofóbicas ao longo das regiões não-polares. As interações hidrofóbicas entre lipídios e entre lipídios e proteínas são os determinantes mais importantes da estrutura das membranas biológicas. As interações hidrofóbicas entre aminoácidos não-polares também estabilizam o enovelamento tridimensional das proteínas. As pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e os solutos polares também provocam alguma organização das moléculas da água, mas o efeito é significativamente menor que aquele observado com solutos não-polares. Parte da força de ligação de um substrato polar (reagente) à superfície complementar polar de uma enzima provém do aumento da entropia, à medida que a enzima desloca a água organizada ao redor do substrato (Fig. 4-8).

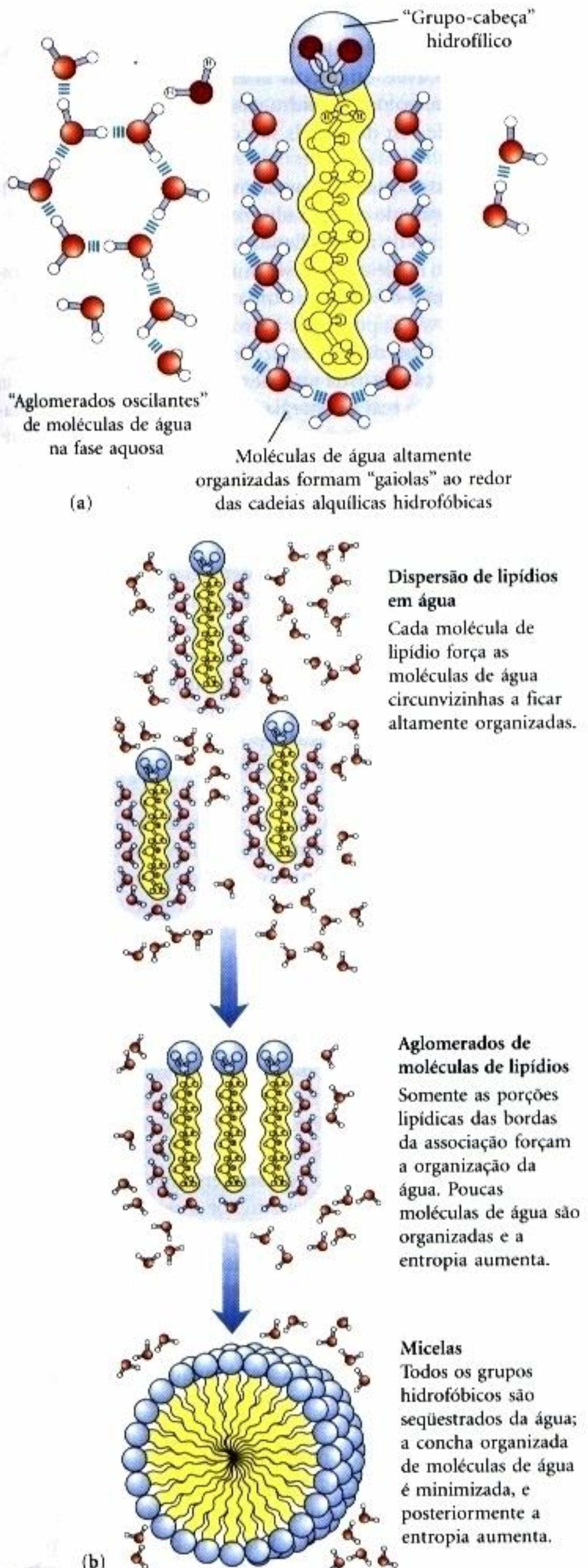

"Grupo-cabeça" hidrofílico
"Aglomerados oscilantes" de moléculas de água na fase aquosa
Moléculas de água altamente organizadas formam "gaiolas" ao redor das cadeias alquílicas hidrofóbicas
(a)
Dispersão de lipídios em água
Cada molécula de lipídio força as moléculas de água circunvizinhas a ficar altamente organizadas.
Aglomerados de moléculas de lipídios
Somente as porções lipídicas das bordas da associação forçam a organização da água. Poucas moléculas de água são organizadas e a entropia aumenta.
Micelas
Todos os grupos hidrofóbicos são seqüestrados da água; a concha organizada de moléculas de água é minimizada, e posteriormente a entropia aumenta.
(b)

Figura 4-7 – Compostos anfipáticos em solução aquosa. (**a**) Os ácidos graxos de cadeia longa têm cadeias alquílicas muito hidrofóbicas, cada uma delas é envolvida por uma camada de moléculas de H_2O altamente ordenadas. (**b**) Agregando-se em micelas, as moléculas de ácidos graxos expõem a menor área superficial hidrofóbica possível à água, e poucas moléculas de água são requeridas na camada ordenada de H_2O. A energia ganha pela liberação das moléculas de H_2O imobilizada estabiliza a micela.

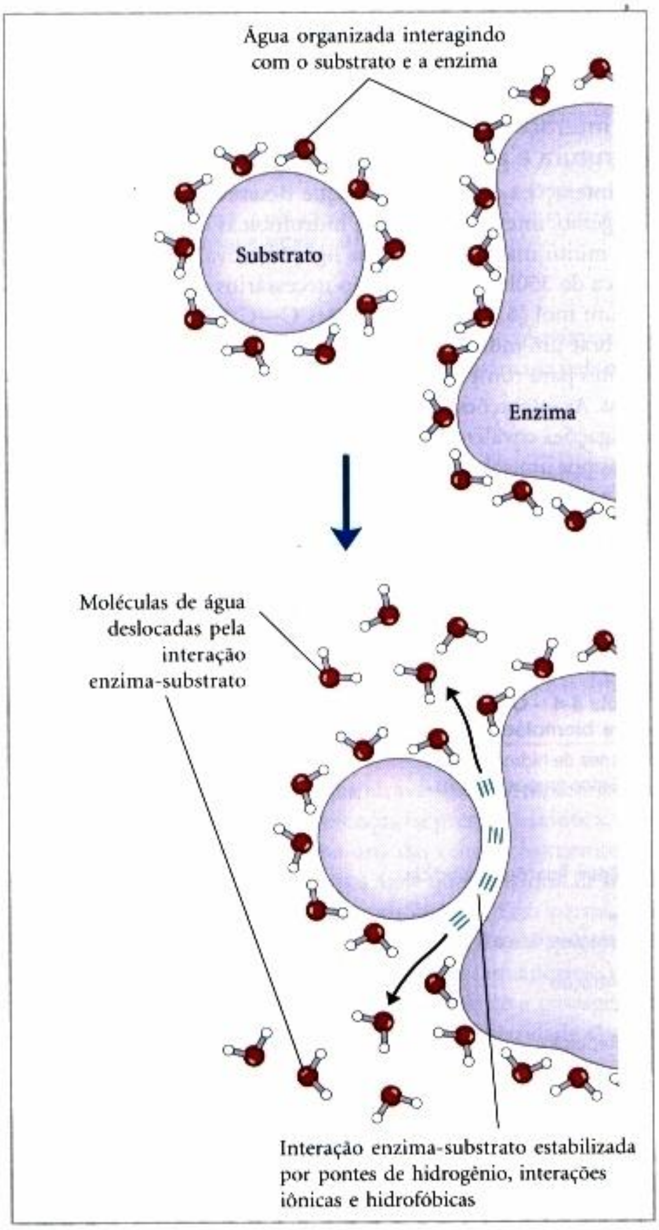

Água organizada interagindo com o substrato e a enzima
Substrato
Enzima
Moléculas de água deslocadas pela interação enzima-substrato
Interação enzima-substrato estabilizada por pontes de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas

Figura 4-8 – A remoção da água organizada favorece a formação do complexo enzima-substrato. Quando separadas, a molécula da enzima e a do substrato forçam as moléculas de água circunvizinhas a se organizarem na forma de uma concha. A ligação do substrato com a enzima libera algumas dessas moléculas organizadas e o aumento da entropia resultante propicia um impulso termodinâmico na direção da formação do complexo enzima-substrato.

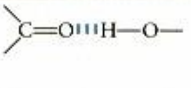
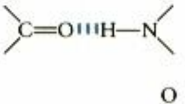
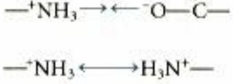
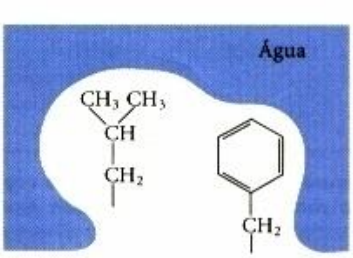
As interações de van der Waals são atrações interatômicas fracas

Quando dois átomos não-carregados se aproximam, as nuvens eletrônicas que os rodeiam passam a influenciar umas às outras. Variações casuais nas posições dos elétrons ao redor de um dos núcleos podem criar um dipolo elétrico transiente, que induz no átomo próximo um outro dipolo elétrico oposto, também transiente. Os dois dipolos se atraem fracamente, aproximando os dois núcleos. Essas atrações fracas são chamadas **interações de van der Waals.** À medida que os dois núcleos se aproximam, as suas nuvens eletrônicas começam a se repelir. Na distância em que a atração de van der Waals contrabalança exatamente essa força repulsiva, os núcleos são considerados estar em contato de van der Waals. Cada átomo tem um **raio de van der Waals** característico: uma medida de quão perto esse átomo permitirá que um outro se aproxime (veja Tabela 3-1). Nos modelos moleculares de "espaço-cheio" mostrados neste livro (por exemplo, Fig. 3-7c), os átomos são representados em tamanhos proporcionais aos seus raios de van der Waals.

As interações fracas são cruciais para a estrutura e a função das macromoléculas

As interações não-covalentes que descrevemos (pontes de hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals) são muito mais fracas que as ligações covalentes (Tabela 4-4). Cerca de 350kJ de energia são necessários para o rompimento de um mol (6×10^{23}) de ligações C—C, e cerca de 410kJ para quebrar um mol de ligações C—H, mas menos de 4kJ são suficientes para romper um mol de interações de van der Waals típicas. As interações hidrofóbicas são igualmente mais fracas que as ligações covalentes, embora sejam substancialmente fortalecidas por um solvente altamente polar (por exemplo, uma solução salina concentrada). As interações iônicas e as pontes de hidrogênio apresentam forças de ligação variáveis, dependendo da polaridade do solvente, mas são sempre significativamente mais fracas que as ligações covalentes. Em uma solução aquosa a 25°C, a energia térmica disponível pode ser da mesma ordem de magnitude, à medida que a força dessas interações fracas e a interação entre as moléculas do soluto e do solvente (água) são quase tão favoráveis quanto as interações soluto-soluto. Conseqüentemente, pontes de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals são continuamente formadas e rompidas.

Tabela 4-4 – Quatro tipos de interações não-covalentes ("fracas") entre biomoléculas dissolvidas em solvente aquoso

Pontes de hidrogênio	
Entre grupos neutros	
Entre ligações peptídicas	
Interações iônicas	
Atração	 $-{}^{+}NH_3 \rightarrow \leftarrow {}^{-}O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-$
Repulsão	$-{}^{+}NH_3 \leftarrow\!\!\rightarrow H_3N^{+}-$
Interações hidrofóbicas	
Interações de van der Waals	Quaisquer dois átomos muito próximos entre si

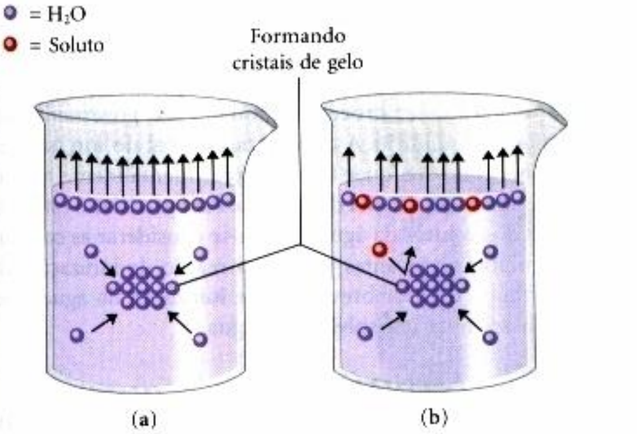
Embora esses quatro tipos de interações sejam individualmente fracos, quando comparados com as ligações covalentes, o efeito cumulativo de muitas dessas interações com uma proteína ou um ácido nucléico pode ser muito significativo. Por exemplo, a ligação não-covalente de uma enzima com seu substrato pode envolver várias pontes de hidrogênio e uma ou mais interações iônicas, bem como interações hidrofóbicas e de van der Waals. A formação de cada uma dessas ligações fracas contribui para a diminuição real da energia livre do sistema. A estabilidade de uma interação não-covalente, tal como a de uma molécula pequena ligada por ponte de hidrogênio a uma macromolécula, pode ser calculada a partir da energia de ligação. A estabilidade, medida pela constante de equilíbrio (veja adiante) da reação de ligação, varia *exponencialmente* com a energia de ligação. A dissociação de duas biomoléculas associadas não-covalentemente por meio de múltiplas interações fracas (como, por exemplo, uma enzima e seu substrato ligado) requer que todas essas interações sejam rompidas ao mesmo tempo. Como essas interações flutuam aleatoriamente, a ruptura simultânea é muito improvável. Assim, a estabilidade molecular conferida por duas, cinco ou vinte interações fracas é, por conseguinte, muito maior que a esperada intuitivamente pela simples adição das pequenas energias de ligação.

Macromoléculas tais como as proteínas, o DNA e o RNA apresentam tantos locais potencialmente favoráveis para a ocorrência de pontes de hidrogênio ou interações iônicas, van der Waals e hidrofóbicas, que o efeito cumulativo dessas pequenas forças de ligação é enorme. No caso das macromoléculas, a estrutura mais estável (nativa) é usualmente aquela na qual as possibilidades de formação de ligações fracas é máxima. Esse princípio determina, também, o enovelamento de uma simples cadeia polipeptídica ou polinucleotídica em sua estrutura tridimensional. A ligação de um antígeno a um anticorpo específico depende do efeito cumulativo de muitas interações fracas. Conforme já salientado anteriormente, a energia liberada quando uma enzima se liga não-covalentemente ao seu substrato é a principal fonte do poder catalítico de uma enzima. A ligação de um hormônio ou de um neurotransmissor a seu receptor celular protéico é o resultado de interações fracas. Uma conseqüência do grande tamanho das enzimas e dos receptores é que a sua extensa superfície proporciona muitas possibilidades de interações fracas. Em nível molecular, a complementaridade entre biomoléculas que interagem reflete a complementaridade e as interações fracas entre grupos polares, carregados e hidrofóbicos na superfície das moléculas.

Os solutos afetam as propriedades coligativas das soluções aquosas

Solutos de qualquer tipo, quando dissolvidos, afetam certas propriedades físicas do solvente água: sua pressão de vapor, ponto de ebulição, ponto de fusão (ponto de congelamento) e pressão osmótica. Estas são as chamadas **propriedades coligativas** ("coligadas"), uma vez que o efeito do soluto sobre essas quatro propriedades tem a mesma base: a concentração da água é menor em soluções que em água pura. O efeito da concentração do soluto nas propriedades coligativas da água não depende das propriedades químicas do soluto; ele depende apenas do *número* de partículas do soluto (moléculas, íons) em uma dada quantidade de água. Um composto como o NaCl, que se dissocia em solução, apresenta um efeito duas vezes maior na pressão osmótica, por exemplo, que o mesmo número de moles de glicose, um soluto que não se dissocia.

Os solutos dissolvidos alteram as propriedades coligativas das soluções aquosas, diminuindo a concentração efetiva da água. Por exemplo, quando uma fração significativa de moléculas na superfície de uma solução aquosa não é a água, mas o solutol, a tendência de as moléculas de água passarem para a fase vapor — pressão de vapor — diminui (Fig. 4-9). Similarmente, a tendência de as moléculas de água passarem da fase aquosa para a superfície de um cristal de gelo em formação é reduzida quando algumas das moléculas que colidem com o cristal são solutos, e não água. Nesse caso, a solução se congelará mais lentamente que a água pura e em uma temperatura mais baixa. Para uma solução aquosa 1,00 molal (1,00 mol de soluto por 1.000g de água) de um soluto ideal, não-volátil e que não se dissocia, a uma pressão de 101kPa (1 atm), o ponto de congelamento é 1,86°C menor e o ponto de ebulição é 0,543°C maior que os da água pura. Para uma solução 0,100 molal, as mudanças são um décimo maiores.



Em água pura, cada molécula na superfície é água e todas elas contribuem para a pressão de vapor. Cada molécula no corpo da solução é água e pode contribuir para a formação de cristais de gelo.

Nesta solução, a concentração efetiva da água é reduzida; apenas três de quatro moléculas na superfície e no corpo da solução são água. A pressão de vapor da água e a tendência de a água líquida formar o cristal são reduzidas proporcionalmente.

Figura 4-9 – Solutos alteram as propriedades coligativas das soluções. (**a**) A uma pressão de 101kPa (1 atm), a água pura ferve a 100°C e se congela a 0°C. (**b**) A presença de moléculas de soluto reduz a probabilidade de as moléculas da água deixarem a solução e passarem para a fase gasosa, reduzindo, assim, a pressão de vapor da solução e aumentando o ponto de ebulição. Similarmente, a probabilidade de uma molécula de água colidir e associar-se a um cristal de gelo em formação é reduzida quando algumas das moléculas que colidem com o cristal são moléculas de solutos, e não água. O efeito é a diminuição do ponto de congelamento.

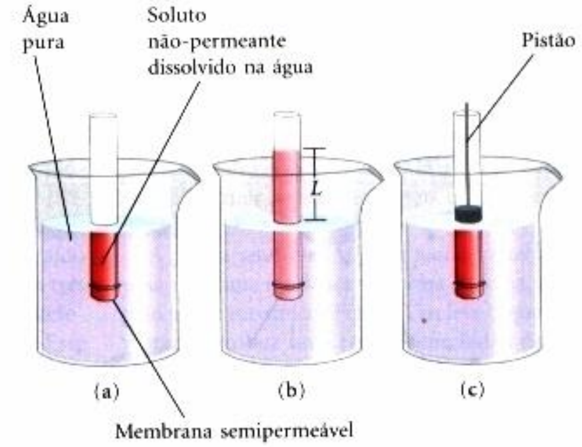


Figura 4-10 – Osmose e medida da pressão osmótica. (**a**) Estado inicial. O tubo contém uma solução aquosa, o béquer contém água pura e a membrana semipermeável permite a passagem de água, mas não a de soluto. A água do béquer flui para o interior do tubo, para igualar a sua concentração, através da membrana. (**b**) Estado final. A água fluiu para a solução do composto não-permeante, diluindo-a e aumentando a coluna de água dentro do tubo. No equilíbrio, a força da gravidade, operando na solução do tubo, contrabalança exatamente a tendência de a água se mover para o interior do tubo, onde a sua concentração é menor. (**c**) A pressão osmótica (Π) é medida como sendo a força que deve ser aplicada para retornar a solução no tubo ao nível da água no béquer. Essa força é proporcional à altura *h* da coluna em (**b**).

As moléculas de água tendem a se movimentar de uma região de maior concentração de água para uma de menor concentração de água. Quando duas soluções aquosas diferentes são separadas por uma membrana semipermeável (que permite a passagem das moléculas da água, mas não as do soluto), as moléculas de água que se difundem da região de concentração de água mais alta para a de concentração de água mais baixa produzem uma pressão osmótica (Fig. 4.10). Essa pressão, Π, medida como sendo a força necessária para resistir ao movimento da água (Fig. 4-10c), é dada de uma maneira aproximada pela equação de van't Hoff:

$$\Pi = icRT$$

onde R é a constante dos gases, e T, a temperatura absoluta. O termo ic é a **osmolaridade** da solução, o produto entre a concentração molar do soluto c e o fator i de van't Hoff, que é a medida do grau de dissociação do soluto em duas ou mais espécies iônicas. Em soluções diluídas de NaCl, o soluto se dissocia completamente em Na^+ e Cl^-, dobrando o número de partículas de soluto, e $i = 2$. Para solutos que não se dissociam, i é sempre igual a 1. Para soluções que contêm vários (n) solutos, Π é o somatório das contribuições de cada espécie:

$$\Pi = RT(i_1c_1 + i_2c_2 + \cdots + i_nc_n)$$

Osmose, movimento da água através de uma membrana semipermeável impelido por diferenças na pressão osmótica, é um importante fator na vida da maioria das células. As membranas plasmáticas são mais permeáveis à água que a maioria de outras moléculas pequenas, íons e macromoléculas. Essa permeabilidade é, em parte, devida a uma simples difusão da água através da bicamada lipídica e a canais de proteínas (aquaporinas) existentes na membrana, cuja seletividade permite a passagem de água. Soluções que apresentam a mesma osmolaridade são chamadas de **isotônicas**. Rodeada por uma solução isotônica, a célula nem ganha nem perde água (Fig. 4-11). Em uma solução **hipertônica**, que apresenta uma osmolaridade maior que a do citosol, a célula murcha à medida que a água flui para a solução. Em uma solução **hipotônica** (de osmolaridade menor), a célula entumece; se não suportada por uma parede celular, eventualmente se rompe. As células geralmente contêm concentrações mais altas de biomoléculas e íons que os seus circunvizinhos, de maneira que a pressão osmótica faz com que a água flua para dentro das células. Se não contrabalançado de alguma maneira, esse movimento de água para dentro distende a membrana plasmática e causa o rompimento da célula (lise osmótica).

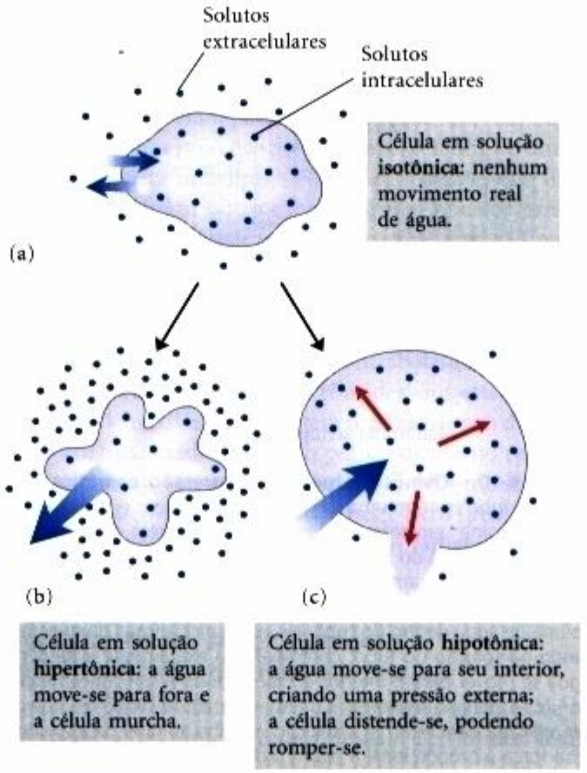

Solutos extracelulares
Solutos intracelulares
Célula em solução isotônica: nenhum movimento real de água.
(a)
(b)
(c)
Célula em solução hipertônica: a água move-se para fora e a célula murcha.
Célula em solução hipotônica: a água move-se para seu interior, criando uma pressão externa; a célula distende-se, podendo romper-se.

Figura 4-11 – O efeito da osmolaridade extracelular no movimento de água através da membrana plasmática. Quando uma célula em equilíbrio osmótico com seu meio circunvizinho (isto é, em meio isotônico) (**a**) é transferida para uma solução hipertônica (**b**) ou hipotônica (**c**), a água move-se através da membrana plasmática na direção em que tende a igualar a osmolaridade dentro e fora da célula.

Três mecanismos foram desenvolvidos para impedir essa catástrofe. Nas bactérias e plantas, a membrana plasmática é circundada por uma parede celular não-expansível, de rigidez e força suficientes para resistir à pressão osmótica e impedir a lise osmótica. Certos protozoários de água doce, que vivem em meio altamente hipotônico, têm uma organela (vacúolo contrátil) que bombeia a água para fora da célula. Nos animais multicelulares, o plasma sangüíneo e o fluido intersticial (fluido extracelular dos tecidos) são mantidos em uma osmolaridade próxima à do citoplasma. A elevada concentração de albumina e outras proteínas no plasma sangüíneo contribui para a sua osmolaridade. As células também bombeiam ativamente íons, tais como o Na^+, para o fluido intersticial, a fim de permanecerem em equilíbrio osmótico com os seus circunvizinhos.

Uma vez que o efeito dos solutos na osmolaridade depende do *número* de partículas dissolvidas, e não de suas *massas*, macromoléculas (proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos) apresentam menor efeito na osmolaridade de uma solução que tem uma igual massa de seus componentes monoméricos. Por exemplo, um *grama* de um polissacarídeo composto por 1.000 unidades de glicose tem o mesmo efeito que um *miligrama* de glicose. Um efeito do armazenamento de combustível na forma de polissacarídeo (amido ou glicogênio), em vez de glicose ou outro açúcar simples, é a prevenção de um enorme aumento da pressão osmótica dentro da célula de armazenamento.

As plantas usam a pressão osmótica para alcançar a rigidez mecânica. A elevada concentração de soluto nos vacúolos empurra água para dentro da célula (veja Fig. 2-10). A pressão osmótica resultante contra a parede da célula (pressão de turgor) enrijece a célula, o tecido e o corpo da planta. Quando a alface na sua salada murcha, é porque a perda de água reduziu a pressão de turgor. Alterações dramáticas na pressão de turgor produzem o movimento de partes da planta, como observado em plantas sensíveis ao toque, tais como a vênus-pega-mosca e a mimosa (Adendo 4-1).

A osmose também apresenta conseqüências para os protocolos de laboratório. As mitocôndrias, os cloroplastos e os lisossomos, por exemplo, são recobertos por membranas semipermeáveis. Durante o isolamento dessas organelas a partir de células rompidas (veja Fig. 2-20), os bioquímicos devem fazer o fracionamento em soluções isotônicas. As soluções-tampão, comumente usadas em fracionamentos celulares, contêm uma concentração suficiente (cerca de 0,2M) de sacarose ou algum outro soluto inerte para proteger as organelas da pressão osmótica.

Ionização da Água, Ácidos Fracos e Bases Fracas

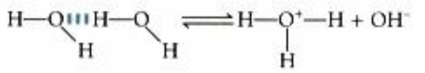
Embora muitas das propriedades solventes da água possam ser explicadas em função das características da molécula de H_2O eletricamente não-carregada, também é necessário levar em consideração o pequeno grau de ionização da água em íons hidrogênio (H^+) e hidroxila (OH^-). Como todas as reações reversíveis, a ionização da água pode ser descrita por uma constante de equilíbrio. Quando ácidos ou bases fracos são dissolvidos na água, eles produzem H^+ por ionização; bases consomem H^+ para ser protonadas. Esses processos também são governados por constantes de equilíbrio. A concentração total do íon hidrogênio originário de qualquer fonte é experimentalmente mensurável e expressa como o pH da solução. Para predizer o estado de ionização dos solutos na água, devem-se considerar as constantes de equilíbrio relevantes para cada reação de ionização. Vamos, portanto, discutir brevemente a ionização da água e dos ácidos e bases fracos dissolvidos na água.

A água pura é ligeiramente ionizada

As moléculas de água têm pequena tendência para se ionizar reversivelmente, produzindo um íon hidrogênio (próton) e um íon hidroxila, por meio do equilíbrio:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (4\text{-}1)$$

Embora freqüentemente mostremos o produto de dissociação como sendo o H^+, prótons livres não existem em solução; os íons hidrogênio formados são imediatamente hidratados até **íons hidrônio** ou **hidroxônio** (H_3O^+). As pontes de hidrogênio entre as moléculas de água tornam a hidratação dos prótons dissociados virtualmente instantânea.



$$\text{H—}\underset{\text{H}}{\text{O}}\cdots\text{H—}\underset{\text{H}}{\text{O}} \rightleftharpoons \text{H—}\underset{\text{H}}{\text{O}^+}\text{—H} + \text{OH}^-$$

A ionização da água pode ser medida por meio da sua condutividade elétrica; a água pura transporta a corrente elétrica à medida que o H^+ migra em direção ao cátodo e o OH^- em direção ao ânodo. O movimento dos íons hidrônio e hidróxido no campo elétrico é anormalmente rápido, comparado com o de outros íons tais como Na^+, K^+ e Cl^-. Essa alta mobilidade iônica resulta de uma espécie de "salto de próton", mostrado na Figura 4-12. Nenhum próton individual se movimenta para muito longe do corpo da solução, mas uma série de pulos de prótons entre moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio causa o movimento real do próton em uma longa distância, em um intervalo de tempo consideravelmente pequeno. Como resultado da alta mobilidade iônica do H^+ (e OH^-,

Adendo 4-1

Resposta ao toque nas plantas: um evento osmótico

As folhas altamente especializadas da vênus-pega-mosca (*Dionaea muscipula*) fecham-se rapidamente em resposta a um leve toque de um inseto ingênuo, aprisionando-o para futura digestão. Atraído pelo néctar da superfície da folha, o inseto toca três pêlos (tricomas) mecanicamente sensíveis, acionando a armadilha que fecha a folha (Fig. 1). Esse movimento da folha é produzido por mudanças súbitas (menos de 0,5s) na pressão de turgor das células mesófilas (células mais internas da folha), provavelmente alcançadas pela saída de íons K^+ das células e pelo efluxo da água, causado pela osmose. As glândulas digestivas da superfície das folhas liberam enzimas que extraem os nutrientes do inseto.

A planta sensitiva (*Mimosa pudica*) também sofre uma marcante mudança na forma da folha, acionada pelo toque mecânico (Fig. 2). Um leve toque ou uma vibração produz uma rápida murchidão das folhas, como resultado da dramática redução na pressão de turgor das células da base de cada folículo e folha. Como no caso da vênus-pega-mosca, a queda da pressão de turgor resulta da liberação de K^+, seguida pelo efluxo da água.

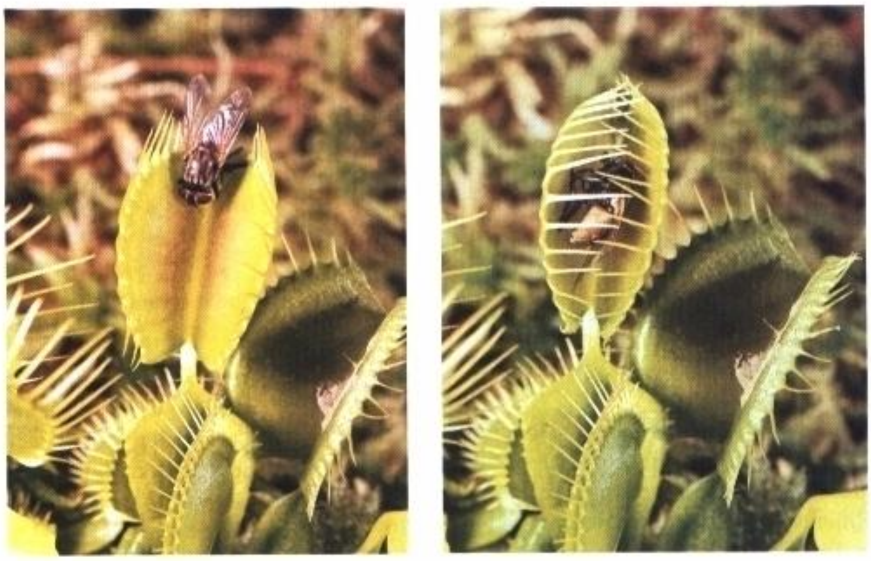

(a) (b)

Figura 1 – Resposta ao toque na vênus-pega-mosca. Ao se aproximar de uma folha aberta, uma mosca (**a**) é aprisionada para ser digerida pela planta (**b**).

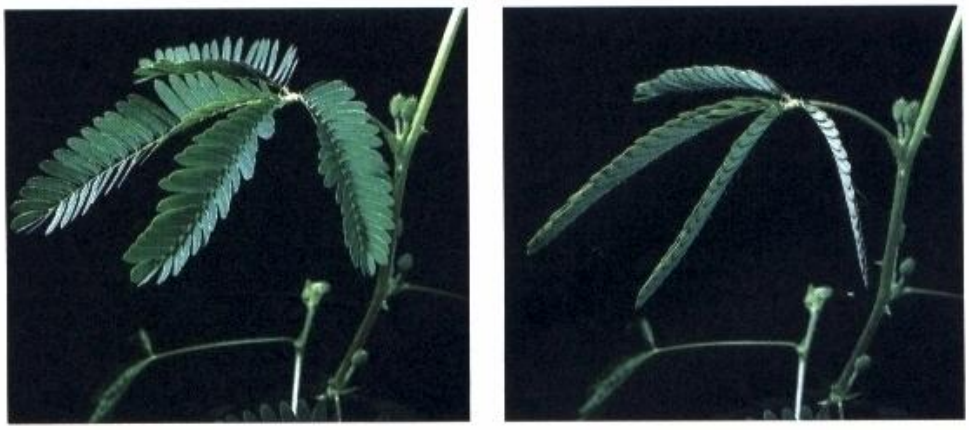

(a) (b)

Figura 2 – Os folículos da planta sensitiva, em forma de pena, (**a**) fecham-se e murcham (**b**), protegendo a planta contra danos estruturais causados pelo vento.

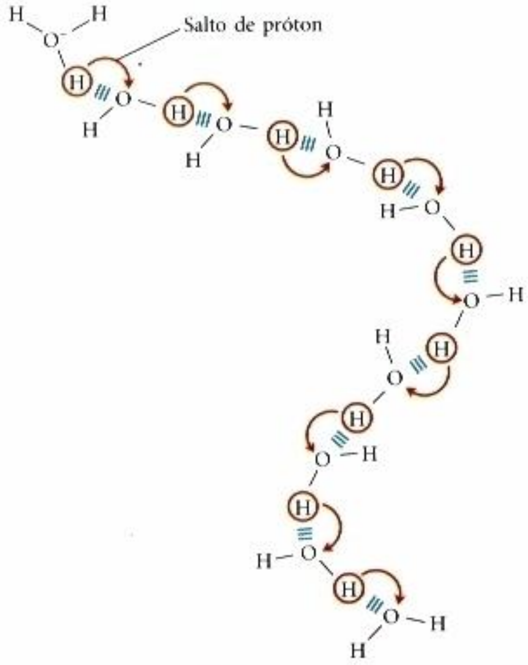


Figura 4-12 – Saltos de prótons. Pequenos "saltos" de prótons em uma série de moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio realizam um movimento real extremamente rápido de um próton em uma longa distância. À medida que o íon hidrônio (acima, à esquerda) cede um próton, uma molécula de água a uma certa distância (abaixo, à direita) aceita um, tornando-se um íon hidrônio. O salto de prótons é muito mais rápido do que a verdadeira difusão e explica a mobilidade consideravelmente elevada dos íons hidrogênio comparada à de outros cátions monovalentes tais como Na^+ ou K^+.

que também se move rapidamente por meio de saltos de prótons, mas na direção oposta), as reações ácido-base, em soluções aquosas, em geral são excepcionalmente rápidas. Muito provavelmente, os saltos de prótons também desempenham uma função nas reações de transferência de prótons em sistemas biológicos.

Uma vez que a ionização reversível é crucial para o papel da água nas funções celulares, devemos expressar a extensão da ionização da água em termos quantitativos. Uma breve revisão de algumas propriedades das reações químicas reversíveis mostrará como isso pode ser feito.

A posição de equilíbrio de qualquer reação química é dada pela sua **constante de equilíbrio, K_{eq}** (algumas vezes expressa apenas por K). Para a reação genérica:

$$A + B \rightleftharpoons C + D \qquad (4\text{-}2)$$

uma constante de equilíbrio pode ser definida em termos da concentração dos reagentes (A e B) e produtos (C e D), presentes no equilíbrio:

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Estritamente falando, os termos de concentração devem ser substituídos pelas *atividades* ou concentrações efetivas em soluções não-ideais, de cada espécie. Exceto em trabalhos muito precisos, a constante de equilíbrio pode ser obtida aproximadamente pela medida das *concentrações* no equilíbrio. Por razões que fogem aos objetivos desta discussão, as constantes de equilíbrio não têm dimensões. Entretanto, vamos conservar a unidade de concentração (M) nas expressões de equilíbrio para lembrar que molaridade é a unidade de concentração usada para calcular K_{eq}.

A constante de equilíbrio é fixa e característica para uma dada reação química a uma temperatura específica. Ela define a composição da mistura no equilíbrio, independentemente das quantidades iniciais dos reagentes e produtos. Reciprocamente, pode-se calcular a constante de equilíbrio para uma dada reação a uma dada temperatura, se as concentrações de equilíbrio de todos os reagentes e produtos forem conhecidas. Vamos mostrar, em um capítulo posterior, que a variação de energia livre padrão ($\Delta G°$) está diretamente relacionada com a K_{eq}.

A ionização da água é expressa por uma constante de equilíbrio

O grau de ionização da água no equilíbrio é pequeno (Eq. 4-1); a 25°C, duas entre 10^9 moléculas em água pura está ionizada a qualquer instante. A constante de equilíbrio para a ionização reversível da água (Eq. 4-1) é:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad (4\text{-}3)$$

Em água pura a 25°C, a concentração da água é 55,5M (valor em gramas de H_2O em um litro de água dividido pela sua massa molecular em gramas: (1.000g/L)/(18,015g/mol)), e essencialmente constante em relação à concentração extremamente baixa dos íons H^+ e OH^-, da ordem de 1×10^{-7}M. Dessa forma, podemos substituir 55,5M na expressão da constante de equilíbrio (Eq. 4-3) para obter:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{55{,}5}$$

que rearranjada fica:

$$(55{,}5M)(K_{eq}) = [H^+][OH^-] = K_w \qquad (4\text{-}4)$$

onde K_w designa o produto (55,5M)(K_{eq}), que corresponde ao **produto iônico da água** a 25°C.

O valor para K_{eq} determinado por medidas de condutividade elétrica da água pura é $1{,}8 \times 10^{-16}$M, a 25°C. Substituindo-se esse valor na Equação 4-4, obtemos o produto iônico da água:

$$K_w = [H^+][OH^-] = (55{,}5M)(1{,}8 \times 10^{-16}M) = 1{,}0 \times 10^{-14}M^2$$

Assim, o produto $[H^+][OH^-]$ em soluções aquosas a 25°C é sempre igual a $1 \times 10^{-14}M^2$. Quando as concentrações de H^+ e OH^- são exatamente iguais, como na água pura, a solução é considerada estar em **pH neutro**. Nesse pH, as concentrações de H^+ e OH^- podem ser calculadas a partir do produto iônico da água, como segue:

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H^+]^2$$

Resolvendo para $[H^+]$ obtemos:

$$[H^+] = \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14}M^2}$$
$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}M$$

Como o produto iônico da água é constante, sempre que $[H^+]$ for maior que 1×10^{-7}M, a $[OH^-]$ precisa ser menor que 1×10^{-7}M, e vice-versa. Quando a concentração de $[H^+]$ é muito alta, como em uma solução de ácido clorídrico, a concentração de $[OH^-]$ deve ser muito baixa. Do produto iônico da água, podemos calcular a concentração de $[H^+]$ se conhecermos a concentração de $[OH^-]$ e vice-versa (Adendo 4-2).

A escala de pH designa as concentrações de H^+ e OH^-

O produto iônico da água, K_w, é a base para a **escala de pH** (Tabela 4-5). Ela é um meio conveniente para designar a concentração de H^+ (e, portanto, de OH^-) em qualquer solução aquosa entre H^+ 1,0M e OH^- 1,0M. O termo **pH** é definido pela expressão:

$$pH = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+]$$

Adendo 4-2

O produto iônico da água: dois problemas ilustrativos

O produto iônico da água possibilita calcular a concentração de H^+ para uma dada concentração de OH^- e vice-versa; isso é mostrado nos problemas a seguir.

1. Qual é a concentração de H^+ em uma solução de NaOH 0,1M?

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Resolvendo para $[H^+]$, obtemos:

$$[H^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \times 10^{-14}M^2}{0{,}1M} = \frac{10^{-14}M^2}{10^{-1}M}$$
$$= 10^{-13}M \text{ (\textit{resposta})}$$

2. Qual é a concentração de OH^- em uma solução na qual a concentração de H^+ é 0,00013M?

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Resolvendo para $[OH^-]$

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} = \frac{1 \times 10^{-14}M^2}{0{,}00013M} = \frac{10^{-14}M^2}{1{,}3 \times 10^{-4}M}$$
$$= 7{,}7 \times 10^{-11}M \text{ (\textit{resposta})}$$

Tabela 4-5 – A escala de pH

$[H^+]$ (M)	pH	$[OH^-]$ (M)	pOH*
10^0 (1)	0	10^{-14}	14
10^{-1}	1	10^{-13}	13
10^{-2}	2	10^{-12}	12
10^{-3}	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	10^{-3}	3
10^{-12}	12	10^{-2}	2
10^{-13}	13	10^{-1}	1
10^{-14}	14	10^0 (1)	0

*Algumas vezes, a expressão pOH é empregada para expressar a basicidade ou a concentração de OH^- de uma solução; o pOH é definido pela expressão pOH = $-\log [OH^-]$, análoga à expressão para o pH. Note que, para todos os casos pH + pOH = 14.

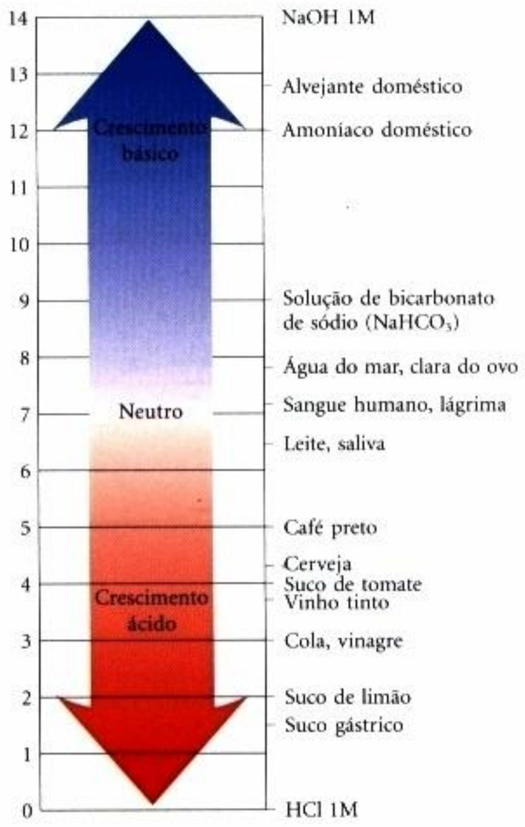


Figura 4-13 – O pH de alguns fluidos aquosos.

O símbolo p denota "logaritmo negativo de". Para uma solução precisamente neutra a 25°C, na qual a concentração de íons hidrogênio é 1×10^{-7}M, o pH pode ser calculado como segue:

$$pH = \log \frac{1}{1{,}0 \times 10^{-7}} = \log (1{,}0 \times 10^7) = \log 1{,}0 + \log 10^7 = 0 + 7 = 7$$

O valor 7 para o pH de uma solução precisamente neutra não é escolhido arbitrariamente; ele deriva do valor absoluto do produto iônico da água a 25°C que, por coincidência conveniente, é um número inteiro. As soluções que têm pH maior que 7 são alcalinas ou básicas; a concentração de OH^- é maior que a de H^+. Por outro lado, soluções que têm pH menor que 7 são ácidas.

Note que a escala de pH é logarítmica, não aritmética. Dizer que duas soluções diferem por uma unidade de pH significa que uma dessas soluções tem uma concentração de H^+ dez vezes maior que a da outra, porém isso não nos diz nada sobre o valor absoluto dessa diferença. A Figura 4-13 mostra o pH de alguns fluidos aquosos comuns. Um refrigerante do tipo cola (pH 3,0) ou vinho tinto (pH 3,7) tem uma concentração de H^+ aproximadamente 10.000 vezes maior que a do sangue (pH 7,4).

O pH de uma solução aquosa pode ser medido aproximadamente, usando-se vários corantes indicadores, como o litmus, a fenolftaleína e o fenol vermelho, que sofrem uma mudança na cor sempre que um próton se dissocia da molécula do corante. Determinações precisas do pH em laboratórios químicos ou clínicos, são feitas com um elétrodo de vidro, que é seletivamente sensível à concentração de H^+, mas insensível à de Na^+, K^+ e outros cátions. Em um aparelho medidor de pH (pHmetro), o sinal elétrico emitido por esse elétrodo é amplificado e comparado com o sinal gerado por uma solução cujo pH é conhecido com precisão.

A medida de pH é um dos procedimentos mais importantes e mais freqüentes em bioquímica. O pH afeta a estrutura e a atividade das macromoléculas biológicas; por exemplo, a atividade catalítica das enzimas depende fortemente do pH (veja Fig. 4-19). As medidas de pH do sangue e da urina são comumente empregadas no diagnóstico médico. O pH do plasma sangüíneo de pessoas com diabetes grave, por exemplo, é freqüentemente menor que o valor normal de 7,4; essa condição é chamada de acidose. Em outros estados patológicos, o pH do sangue é maior que o normal, e essa condição é conhecida como alcalose.

Ácidos fracos e bases fracas têm constantes de dissociação características

O ácido clorídrico, o ácido sulfúrico e o ácido nítrico, comumente chamados de ácidos fortes, estão completamente ionizados quando em soluções aquosas diluídas; as bases fortes NaOH e KOH também estão completamente ionizadas. O maior interesse dos bioquímicos são as propriedades dos ácidos e bases fracos — aqueles que não estão completamente ionizados quando dissolvidos na água. Eles são muito comuns nos sistemas biológicos e têm importantes papéis no metabolismo e na sua regulação. O comportamento de soluções aquosas dos ácidos e bases fracos será mais bem compreendido, se definirmos primeiro alguns termos.

Os ácidos podem ser definidos como doadores de prótons, e as bases, como aceptoras de prótons. Um doador de prótons e seu aceptor correspondente constituem um **par ácido-base conjugado** (Fig. 4-14). O ácido acético (CH_3COOH), um doador de prótons, e o ânion acetato (CH_3COO^-), o correspondente aceptor de prótons, constituem o par ácido-base conjugado, relacionados pela reação reversível

$$CH_3COOH \rightleftharpoons H^+ + CH_3COO^-$$

Cada ácido tem uma tendência característica de perder o seu próton em solução aquosa. Quanto mais forte o ácido, maior a tendência para perder o seu próton. A tendência de qualquer ácido (HA) de perder um próton e formar a sua base conjugada (A^-) é definida pela constante de equilíbrio (K_{eq}) da reação reversível

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

que é:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$$

As constantes de equilíbrio para as reações de ionização são usualmente chamadas de **constantes de dissociação**, geralmente designadas K_a. As constantes de dissociação de alguns ácidos são mostradas na Figura 4-14. Ácidos mais fortes, como o fosfórico e o carbônico, têm constantes de dissociação maiores; os ácidos mais fracos, como o monoidrogeniofosfato (HPO_4^{2-}), têm constantes de dissociação menores.

Na Figura 4-14 também estão incluídos os valores de **pK_a**, que é análogo ao pH e definido pela equação:

$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

Quanto maior a tendência para dissociar um próton, mais forte é o ácido e menor é o seu pK_a. Como veremos agora, o pK_a de qualquer ácido fraco pode ser determinado muito facilmente.

As curvas de titulação revelam o pK_a dos ácidos fracos

A titulação é usada para determinar a concentração de um ácido em uma dada solução. Um volume conhecido do ácido é titulado com uma solução de uma base forte, usualmente o hidróxido de sódio (NaOH), de concentração conhecida. O hidróxido é adicionado em pequenos volumes até que o ácido seja totalmente consumido (neutralizado), como determinado por um corante indicador ou pelo uso de um pHmetro. A concentração do ácido na solução original pode ser calculada a partir do volume e da concentração do NaOH adicionado.

O gráfico dos valores de pH em função do volume de NaOH adicionado (uma **curva de titulação**) revela o pK_a do ácido fraco. Considere a titulação de uma solução 0,1M de ácido acético (para simplificar designe como HAc) com NaOH 0,1M a 25°C (Fig. 4-15).

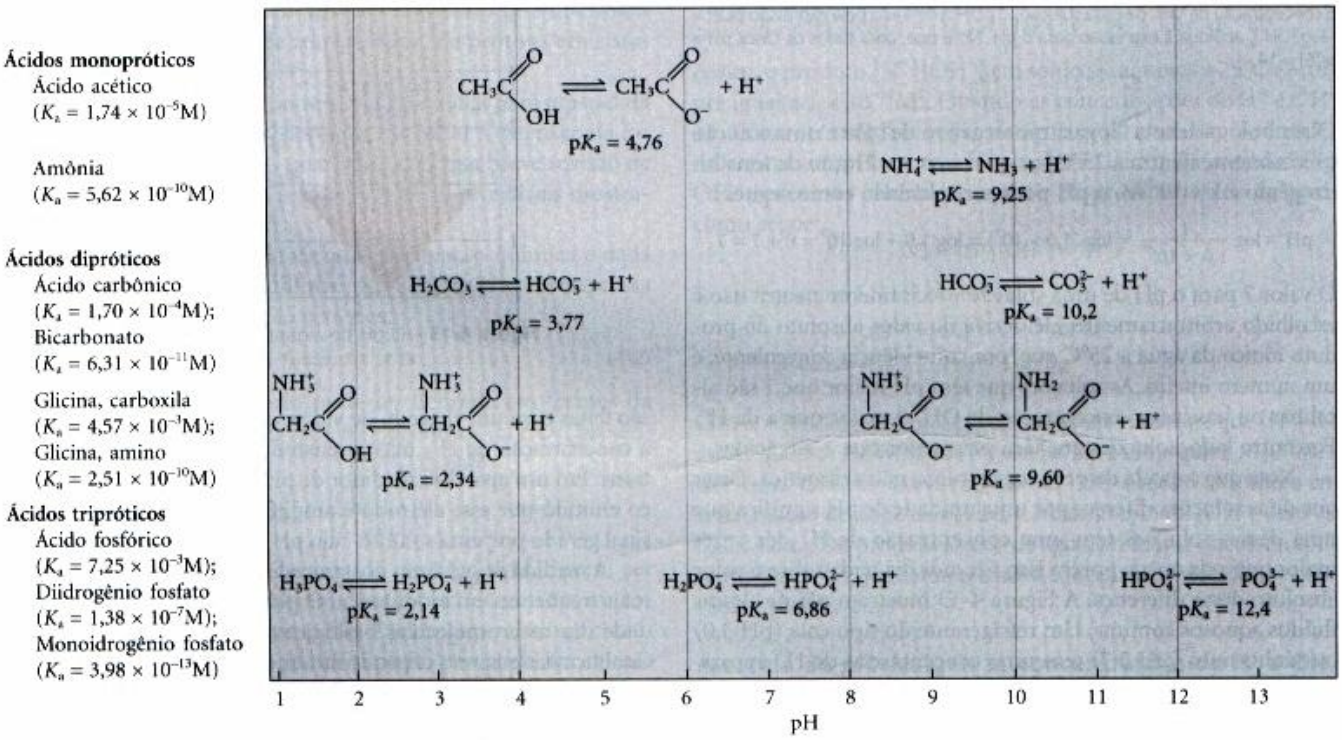

Ácidos monopróticos
Ácido acético
(Ka = 1,74 × 10⁻⁵M)
Amônia
(Ka = 5,62 × 10⁻¹⁰M)
Ácidos dipróticos
Ácido carbônico
(Ka = 1,70 × 10⁻⁴M);
Bicarbonato
(Ka = 6,31 × 10⁻¹¹M)
Glicina, carboxila
(Ka = 4,57 × 10⁻³M);
Glicina, amino
(Ka = 2,51 × 10⁻¹⁰M)
Ácidos tripróticos
Ácido fosfórico
(Ka = 7,25 × 10⁻³M);
Diidrogênio fosfato
(Ka = 1,38 × 10⁻⁷M);
Monoidrogênio fosfato
(Ka = 3,98 × 10⁻¹³M)
CH3COOH ⇌ CH3COO⁻ + H⁺
pKa = 4,76
NH4⁺ ⇌ NH3 + H⁺
pKa = 9,25
H2CO3 ⇌ HCO3⁻ + H⁺
pKa = 3,77
HCO3⁻ ⇌ CO3²⁻ + H⁺
pKa = 10,2
pKa = 2,34
pKa = 9,60
H3PO4 ⇌ H2PO4⁻ + H⁺
pKa = 2,14
H2PO4⁻ ⇌ HPO4²⁻ + H⁺
pKa = 6,86
HPO4²⁻ ⇌ PO4³⁻ + H⁺
pKa = 12,4
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
pH

Figura 4-14 – Os pares ácido-base conjugados são constituídos de um doador de prótons e um aceptor de prótons. Alguns compostos, como o ácido acético e a amônia, são monopróticos: podem doar apenas um único próton. Outros são dipróticos (H_2CO_3 e glicina) ou tripróticos (H_3PO_4). As reações de dissociação para cada par são mostradas onde elas ocorrem ao longo da escala de pH. A constante de equilíbrio ou de dissociação (K_a) e seu logaritmo negativo, o pK_a, são mostrados para cada reação.

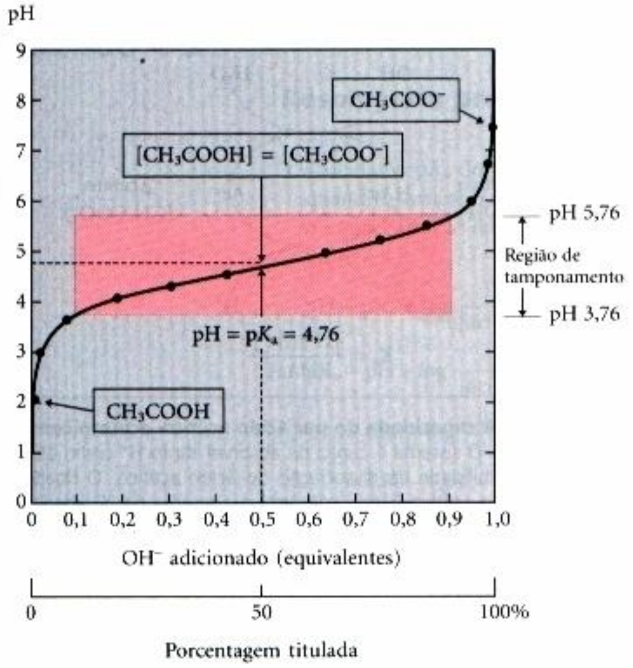


Figura 4-15 – Curva de titulação do ácido acético. Após a adição de um pequeno volume de NaOH à solução de ácido acético, o pH da mistura é medido. Essa operação é repetida até que o ácido seja convertido em sua forma desprotonada, o acetato. O valor de cada adição é lançado em gráfico em função do pH da mistura. Dessa forma, os pontos obtidos constituem a curva de titulação. Nos retângulos são mostradas as formas iônicas predominantes do ácido acético nos pontos designados. No ponto médio da titulação, as concentrações do doador e do aceptor de prótons são iguais, e o pH nesse ponto é numericamente igual ao pK_a. A região sombreada é a região de maior capacidade tamponante útil, geralmente entre 10% e 90% da titulação do ácido fraco.

Dois equilíbrios reversíveis estão envolvidos no processo:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (4\text{-}5)$$

$$HAc \rightleftharpoons H^+ + Ac^- \qquad (4\text{-}6)$$

O equilíbrio deve-se ajustar simultaneamente às suas constantes de equilíbrio características, que são respectivamente:

$$K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14} M^2 \qquad (4\text{-}7)$$

$$K_a = \frac{[H^+][Ac^-]}{[HAc]} = 1{,}74 \times 10^{-5} M \qquad (4\text{-}8)$$

No início da titulação, antes da adição da solução de NaOH, o ácido acético já está ligeiramente ionizado, em uma extensão que pode ser calculada a partir da sua constante de dissociação (Eq. 4-8).

À medida que o NaOH é adicionado gradualmente, o íon OH^- adicionado combina-se com o H^+ livre na solução para formar água, em uma quantidade que satisfaz a relação de equilíbrio da Equação 4-7. Com a remoção do íon H^+, a molécula de HAc dissocia-se, sobretudo para satisfazer a sua própria constante de equilíbrio (Eq. 4-8). Como resultado, à medida que a titulação prossegue com a adição de NaOH, mais e mais HAc ioniza-se, formando Ac^-. No ponto médio da titulação, onde exatamente 0,5 equivalente de NaOH foi adicionado, metade do ácido acético original dissociou-se, de tal forma que a concentração do doador de prótons [HAc] agora se iguala à do aceptor de prótons $[Ac^-]$. No ponto médio ocorre uma relação importante: o pH da solução equimolar de ácido acético e acetato é exatamente igual ao pK_a do ácido acético ($pK_a = 4{,}76$; veja Figs. 4-14, 4-15). Os fundamentos dessa relação, válida para todos os ácidos fracos, logo tornar-se-ão claros.

À medida que a titulação prossegue com a adição de novos volumes de NaOH, o ácido acético não-dissociado remanescente é gradualmente convertido em acetato. O ponto final da titulação ocorre ao redor de pH 7: todo o ácido acético perdeu os seus prótons para íons OH^-, formando H_2O e acetato. Os dois equilíbrios (Eqs. 4-5 e 4-6) coexistem ao longo da titulação, cada um satisfazendo a sua constante de equilíbrio.

A Figura 4-16 compara as curvas de titulação de três ácidos fracos com constantes de dissociação muito diferentes: ácido acético ($pK_a = 4{,}76$); diidrogênio fosfato, $H_2PO_4^-$ ($pK_a = 6{,}86$) e íon amônio, NH_4^+ ($pK_a = 9{,}25$). Embora as curvas de titulação desses ácidos tenham exatamente a mesma forma, elas estão deslocadas ao longo do eixo do pH porque esses ácidos possuem forças diferentes. O ácido acético é o mais forte (perde o seu próton mais rapidamente) porque o seu K_a é o maior (pK_a menor). O ácido acético já está 50% dissociado em pH 4,76. O diidrogênio fosfato perde o seu próton de forma menos rápida, tornando-se 50% dissociado em pH 6,86. O íon amônio é o ácido mais fraco dos três e somente em pH 9,25 atinge 50% de dissociação.

O detalhe mais importante na curva de titulação de um ácido fraco é que ela mostra graficamente que um ácido fraco e o seu ânion — um par ácido-base conjugado — podem funcionar como um tampão.

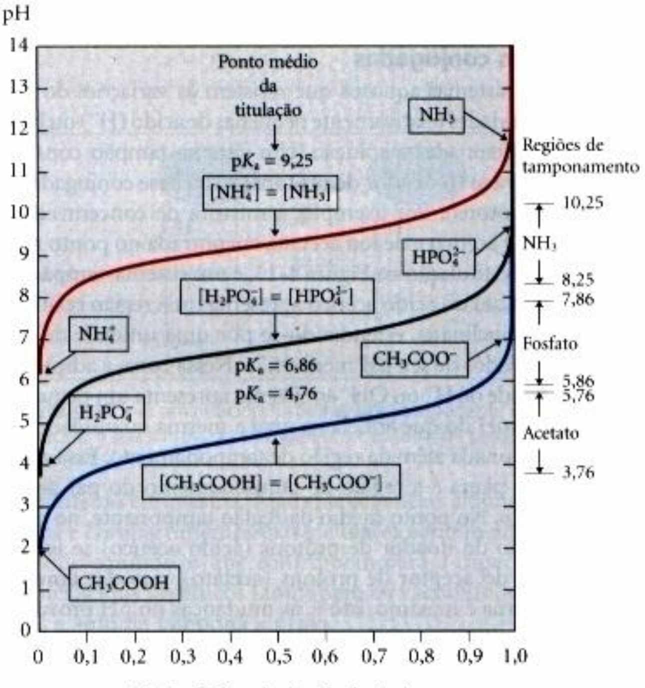


Figura 4-16 – Comparação das curvas de titulação de três ácidos fracos, CH_3COOH, $H_2PO_4^-$ e NH_4^+. As formas iônicas predominantes nos pontos indicados na curva de titulação estão colocadas em retângulos. As regiões de capacidade tamponante estão indicadas à direita. Os pares ácido-base conjugados são tampões efetivos entre, aproximadamente, 10% e 90% da neutralização da espécie doadora de prótons.

Ação Tamponante contra as Variações de pH nos Sistemas Biológicos

Quase todos os processos biológicos são dependentes do pH; uma pequena variação no pH produz uma grande variação na velocidade do processo. Isso é verdade não apenas para muitas reações nas quais o íon H^+ é participante direto, mas também para aquelas nas quais não há um papel aparente para esses íons. As enzimas que catalisam as reações celulares e muitas das moléculas sobre as quais elas agem possuem grupos ionizáveis com valores de pK_a característicos. Os grupos amino e os grupos carboxila protonados dos aminoácidos e os grupos fosfato dos nucleotídeos, por exemplo, funcionam como ácidos fracos; o seu estado iônico depende do pH do meio circunvizinho. Como mencionado, as interações iônicas estão entre as forças que estabilizam a molécula de uma proteína e permitem que uma enzima reconheça e ligue-se a seu substrato.

As células e os organismos mantêm um pH citosólico constante e específico, geralmente próximo de pH 7, o que mantém as biomoléculas em seu estado iônico ótimo. Em organismos multicelulares, o pH dos fluidos extracelulares também é precisamente regulado. A constância do pH é conseguida primariamente pelos tampões biológicos: misturas de ácidos fracos e suas bases conjugadas.

Descreveremos aqui o equilíbrio de ionização responsável pela ação tamponante e mostraremos a relação quantitativa entre o pH de uma solução tamponada e o pK_a do tampão. A ação tamponante biológica pode ser ilustrada pela descrição do funcionamento dos sistemas-tampão fosfato e carbonato em seres humanos.

Os tampões são misturas de ácidos fracos e suas bases conjugadas

Tampões são sistemas aquosos que resistem às variações do pH quando quantidades relativamente pequenas de ácido (H^+) ou base (OH^-) são adicionadas à solução. Um sistema-tampão consiste de um ácido fraco (o doador de prótons) e sua base conjugada (o aceptor de prótons). Por exemplo, a mistura de concentrações iguais de ácido acético e de íon acetato, encontrada no ponto médio da curva de titulação na Figura 4-15, é um sistema-tampão. A curva de titulação do ácido acético apresenta uma região relativamente pouco inclinada, estendendo-se por uma unidade de pH em ambos os lados de seu pH médio 4,76. Nessa zona, a adição de uma quantidade de H^+ ou OH^- ao sistema apresenta um pequeno efeito sobre o pH do que aquela na qual a mesma quantidade tenha sido adicionada além da região de tamponamento. Essa zona relativamente plana é a região de tamponamento do par ácido acético–acetato. No ponto médio da região tamponante, no qual a concentração do doador de prótons (ácido acético) se iguala exatamente a do aceptor de prótons (acetato), o poder tamponante do sistema é máximo, isto é, as mudanças no pH provocadas pela adição de H^+ ou OH^- são mínimas. Nesse ponto da curva de titulação do ácido acético, o pH é igual ao seu pK_a. O pH do sistema-tampão acetato varia ligeiramente quando uma pequena quantidade de H^+ ou OH^- é adicionada, porém essa variação é muito pequena quando comparada com a variação de pH que resultaria se a mesma quantidade de H^+ ou OH^- fosse adicionada à água pura ou a uma solução de um sal de ácido forte com base forte, como o NaCl, que não tem poder tamponante.

O tamponamento resulta do equilíbrio de duas reações reversíveis que ocorrem em uma solução que contém quantidades quase iguais de um doador e seu aceptor de prótons conjugado. A Figura 4-17 explica como um sistema-tampão funciona. Sempre que H^+ ou OH^- são adicionados a um tampão, o resultado é uma pequena variação na relação das concentrações relativas do ácido fraco e de seu ânion e, conseqüentemente, uma pequena variação no pH. A diminuição da concentração de um dos componentes do sistema é contrabalançada exatamente pelo aumento da outra. A soma das concentrações dos componentes do tampão não varia, apenas a sua relação.

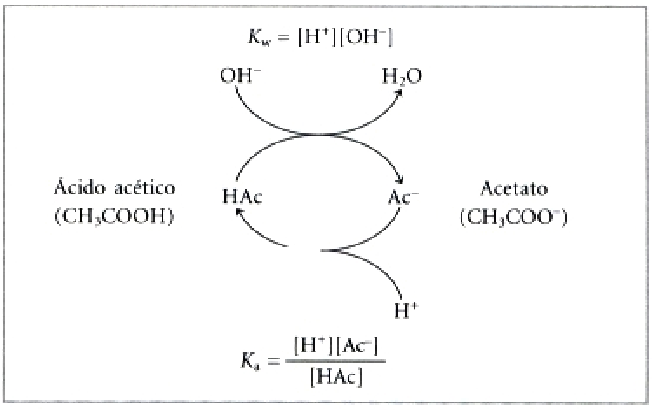


Figura 4-17 – A capacidade do par ácido acético–acetato como solução tampão. O sistema é capaz de absorver tanto H^+ como OH^- por meio da reversibilidade da dissociação do ácido acético. O doador de prótons, o ácido acético (HAc), contém uma reserva de H^+ ligado, que pode ser liberada para neutralizar uma adição de OH^- ao sistema, resultando na formação de H_2O. Isso acontece porque o produto $[H^+][OH^-]$ excede transitoriamente o K_w ($1 \times 10^{-14} M^2$). O equilíbrio rapidamente se ajusta de tal forma que esse produto permaneça igual a $1 \times 10^{-14} M^2$ (a 25°C), reduzindo transitoriamente a concentração de H^+. Como conseqüência, o quociente $[H^+][Ac^-]/[HAc]$ é menor que o K_a, então, o HAc dissocia-se, sobretudo, para restaurar o equilíbrio. De forma semelhante, a base conjugada, Ac^-, pode reagir com os íons H^+ adicionados ao sistema; novamente, as duas reações de ionização entram simultaneamente em equilíbrio. Assim, um par ácido-base conjugado, como o ácido acético e o íon acetato, resiste às variações no pH quando quantidades relativamente pequenas de ácido ou base são adicionadas à solução. A ação tamponante é simplesmente a conseqüência de duas reações reversíveis que ocorrem simultaneamente e atingem seus pontos de equilíbrio de acordo com suas constantes de equilíbrio, K_w e K_a.

Cada par ácido-base conjugado tem uma zona característica de pH na qual ele atua como um tampão efetivo (Fig. 4-16). O par $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ tem um pK_a de 6,86 e, por isso, funciona como um sistema-tampão eficiente no intervalo de pH compreendido entre 5,9 e 7,9. O par NH_4^+/NH_3, com um pK_a de 9,25, pode agir como tampão entre aproximadamente 8,3 e 10,3.

Uma expressão simples relaciona o pH, o p*K* e a concentração do tampão

As curvas de titulação do ácido acético, $H_2PO_4^-$ e NH_4^+ (Fig. 4-16) apresentam formas aproximadamente iguais, sugerindo que essas curvas reflitam uma relação ou lei fundamental. De fato esse é o caso. A forma da curva de titulação de qualquer ácido fraco é descrita pela **equação de Henderson-Hasselbalch**, que é importante para a compreensão da ação tamponante e o balanço ácido-base no sangue e tecidos dos vertebrados. Essa equação é simplesmente uma maneira útil de redefinir a expressão para a constante de dissociação de um ácido. Para a dissociação de um ácido fraco HA em H^+ e A^-, a equação de Henderson-Hasselbalch pode ser derivada da seguinte maneira:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Resolvendo primeiramente para $[H^+]$:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Aplicando-se o logaritmo negativo dos dois lados da igualdade:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Substituindo $-\log [H^+]$ por pH, e $-\log K_a$ por pK_a:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Adendo 4-3

Resolvendo problemas usando a equação de Henderson-Hasselbalch

1. Calcular o pK_a do ácido láctico, sabendo-se que, quando a concentração de ácido láctico é 0,010M e a concentração de lactato é 0,087M, o pH da solução é 4,8.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{lactato}]}{[\text{ácido láctico}]}$$

$$pK_a = pH - \log \frac{[\text{lactato}]}{[\text{ácido láctico}]}$$

$$= 4{,}80 - \log \frac{0{,}087}{0{,}010} = 4{,}80 - \log 8{,}7$$

$$= 4{,}80 - 0{,}94 = 3{,}86 \ (\textit{resposta})$$

2. Calcular o pH de uma mistura que contém ácido acético 0,1M e acetato de sódio 0,2M. O pK_a do ácido acético é 4,76.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$= 4{,}76 + \log \frac{0{,}2}{0{,}1} = 4{,}76 + 0{,}301$$

$$= 5{,}06 \ (\textit{resposta})$$

3. Calcular a relação entre as concentrações de acetato e de ácido acético requerida para um sistema-tampão com pH 5,3.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$\log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]} = pH - pK_a$$

$$= 5{,}30 - 4{,}76 = 0{,}54$$

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]} = \text{antilog } 0{,}54 = 3{,}47 \ (\textit{resposta})$$

Invertendo-se a fração $-\log [HA]/[A^-]$, inverte-se o sinal e obtém-se a equação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Que pode ser escrita em sua forma genérica:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{aceptor de prótons}]}{[\text{doador de prótons}]}$$

Essa equação descreve as curvas de titulação de todos os ácidos fracos e possibilita deduzir um grande número de relações quantitativas importantes. Por exemplo, ela mostra por que o pK_a de um ácido fraco é igual ao pH da solução no ponto médio da sua titulação. Nesse ponto $[HA] = [A^-]$ e

$$pH = pK_a + \log 1{,}0 = pK_a + 0 = pK_a$$

Conforme mostrado no Adendo 4-3, a equação de Henderson-Hasselbalch também permite (1) calcular o pK_a a partir do pH e da razão molar entre o doador e o aceptor de prótons; (2) calcular o pH a partir do pK_a e da razão molar entre o doador e o aceptor de prótons, e (3) calcular a razão molar entre o doador e o aceptor de prótons, dado o pH e o pK_a.

Os ácidos fracos ou as bases fracas tamponam as células e os tecidos contra as variações de pH

Os fluidos intra e extracelulares dos organismos multicelulares apresentam um pH característico e praticamente constante. A primeira linha de defesa do organismo contra mudanças no pH interno é proporcionada pelos sistemas-tampão. O citoplasma da maioria das células contém altas concentrações de proteínas, que possuem muitos aminoácidos com grupos funcionais que são ou ácidos ou bases fracos. Por exemplo, a cadeia lateral da histidina (Fig. 4-18) tem um pK_a de 6,0; desse modo, proteínas que contêm resíduos de histidina podem tamponar efetivamente ao redor do pH neutro. Nucleotídeos como o ATP, bem como muitos outros metabólitos de baixo peso molecular, apresentam grupos ionizáveis que podem contribuir para o poder tamponante do citoplasma. Algumas organelas altamente especializadas e compartimentos extracelulares contêm altas concentrações de compostos que contribuem para a capacidade tamponante: ácidos orgânicos tamponam os vacúolos de células vegetais; a amônia tampona a urina.

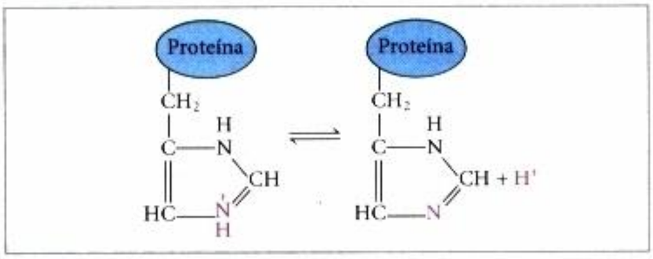


Figura 4-18 – O aminoácido histidina, um componente das proteínas, é um ácido fraco. O pK_a do nitrogênio protonado da cadeia lateral é 6,0.

Dois tampões biologicamente importantes são os sistemas fosfato e bicarbonato. O sistema-tampão fosfato, que age no citoplasma de todas as células, consiste de $H_2PO_4^-$ como doador de prótons e HPO_4^{2-} como aceptor de prótons:

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{2-}$$

O sistema-tampão fosfato tem sua efetividade máxima em um pH próximo do seu pK_a de 6,86 (Figs. 4-14 e 4-16) e, portanto, resiste às variações de pH na região entre 5,9 e 7,9. Assim, ele é um tampão efetivo nos fluidos biológicos. Nos mamíferos, por exemplo, os fluidos extracelulares e a maioria dos compartimentos citoplasmáticos têm um pH na região entre 6,9 e 7,4.

O plasma sangüíneo é tamponado em parte pelo sistema-tampão bicarbonato que consiste de ácido carbônico (H_2CO_3) como doador de prótons e de bicarbonato (HCO_3^-) como aceptor de próton:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Esse sistema é mais complexo que o outro par ácido-base conjugado, uma vez que um de seus componentes, o ácido carbônico (H_2CO_3), é formado a partir de dióxido de carbono dissolvido (d) e água, por uma reação reversível:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

$$K_2 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)][H_2O]}$$

O ácido carbônico é um gás em condições normais, e a concentração do CO_2 dissolvido é o resultado do equilíbrio do CO_2 da fase gasosa:

$$CO_2(g) \rightleftharpoons CO_2(d)$$

$$K_3 = \frac{[CO_2(d)]}{[CO_2(g)]}$$

O pH do sistema-tampão bicarbonato depende da concentração de H_2CO_3 e HCO_3^-, o doador e o aceptor de prótons, respectivamente. A concentração de H_2CO_3, por sua vez, depende da concentração do CO_2 dissolvido, que depende da concentração do CO_2 na fase gasosa, denominada **pressão parcial** do CO_2. Dessa forma, o pH do tampão bicarbonato exposto a uma fase gasosa é, em última análise, determinado pela concentração de HCO_3^- na fase aquosa e pela pressão parcial de CO_2 na fase gasosa (Adendo 4-4).

O sangue humano normalmente tem um pH próximo a 7,4. Sempre que os mecanismos reguladores do pH falham ou são sobrepujados, como pode acontecer em casos de diabetes grave e não-controlado, nos quais uma superprodução metabólica de ácidos causa acidose, o pH do sangue pode cair para 6,8 ou menos, provocando danos celulares irreparáveis e morte. Em outras doenças, o pH pode elevar-se a níveis letais. Embora muitos aspectos da estrutura celular e seu funcionamento sejam influenciados pelo pH, é a atividade catalítica das enzimas que é especialmente sensível. As enzimas apresentam uma atividade catalítica máxima em um pH característico, chamado de **pH ótimo** (Fig. 4-19). Em cada um dos lados do pH ótimo, a atividade enzimática diminui rapidamente. Assim, uma pequena variação no pH pode provocar uma grande diferença na velocidade de algumas reações cruciais, catalisadas enzimaticamente. O controle biológico do pH das células e dos fluidos corporais é, portanto, de importância central em todos os aspectos das atividades celulares e do metabolismo.

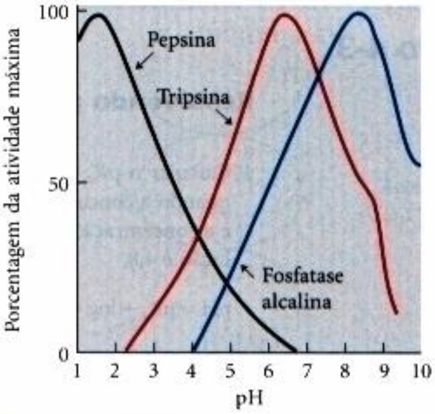


Figura 4-19 – O pH ótimo de algumas enzima. A pepsina é uma enzima digestiva secretada no suco gástrico; a tripsina, uma enzima digestiva que age no intestino delgado; a fosfatase alcalina do tecido ósseo, uma enzima hidrolítica envolvida na mineralização do osso.

Adendo 4-4

Sangue, pulmões e tampão: o sistema-tampão bicarbonato

Nos animais com pulmões, o sistema-tampão bicarbonato é um tampão fisiológico efetivo ao redor de pH 7,4 porque o H_2CO_3 do plasma sangüíneo está em equilíbrio com um reservatório de $CO_2(g)$ de grande capacidade localizado no espaço aéreo dos pulmões. Esse sistema-tampão envolve três equilíbrios reversíveis entre o CO_2 gasoso nos pulmões e o bicarbonato (HCO_3^-) no plasma sangüíneo (Fig. 1). Quando H^+ (do ácido láctico produzido no tecido muscular durante um exercício vigoroso, por exemplo) é adicionado ao sangue, à medida que ele passa através dos tecidos, a reação 1 desloca-se para um novo equilíbrio, em que a concentração de H_2CO_3 é maior. Isso aumenta a concentração de $CO_2(d)$ no sangue (reação 2), que aumenta a pressão de $CO_2(g)$ no espaço aéreo pulmonar (reação 3); o CO_2 extra é expirado.

Reciprocamente, quando o pH do plasma sangüíneo aumenta (em virtude da produção de NH_3 durante o catabolismo de proteínas, por exemplo), ocorrem eventos opostos: a concentração de H^+ no plasma sangüíneo diminui, provocando a dissociação do H_2CO_3 em H^+ e HCO_3^-. Isso causa uma maior dissolução de $CO_2(g)$ dos pulmões, no plasma sangüíneo. A velocidade respiratória, isto é, a velocidade com que o CO_2 é inalado e expirado, pode ajustar rapidamente esses equilíbrios com a finalidade de manter o pH do sangue praticamente constante.

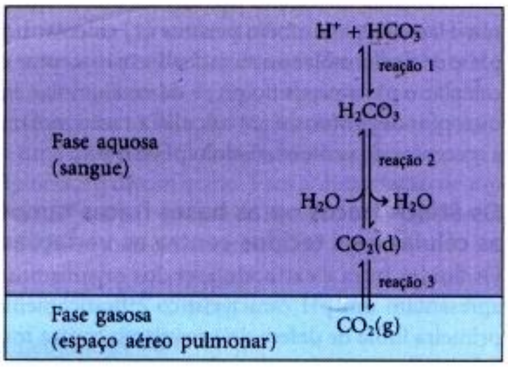


Figura 1 – O CO_2 existente no espaço aéreo dos pulmões está em equilíbrio com o tampão bicarbonato no plasma sangüíneo que atravessa os capilares alveolares. Como a concentração do CO_2 dissolvido pode ser ajustada rapidamente por meio de mudanças na velocidade da respiração pulmonar, o sistema-tampão bicarbonato do sangue está quase sempre em equilíbrio com um grande reservatório de CO_2.

A Água como Reagente

A água não é apenas o solvente no qual ocorrem as reações químicas das células vivas; muito freqüentemente ela é um participante direto dessas reações. A formação de ATP a partir do ADP e de fosfato inorgânico é uma **reação de condensação** (pág. 53) na qual os elementos da água são eliminados (Fig. 4-20a). O reverso dessa reação — a quebra acompanhada pela adição de elementos da água — é uma **reação de hidrólise**. As reações de hidrólise são responsáveis pela despolimerização enzimática de proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos ingeridos na alimentação. As reações de hidrólise, catalisadas por enzimas chamadas **hidrolases**, são invariavelmente endergônicas. A formação de polímeros celulares a partir de suas subunidades pela simples reversão da hidrólise seria endergônica e, como tal, não ocorre. Como veremos, as células contornam esse obstáculo termodinâmico acoplando reações de condensação endergônicas aos processos exergônicos, como a quebra de uma ligação anidrido no ATP.

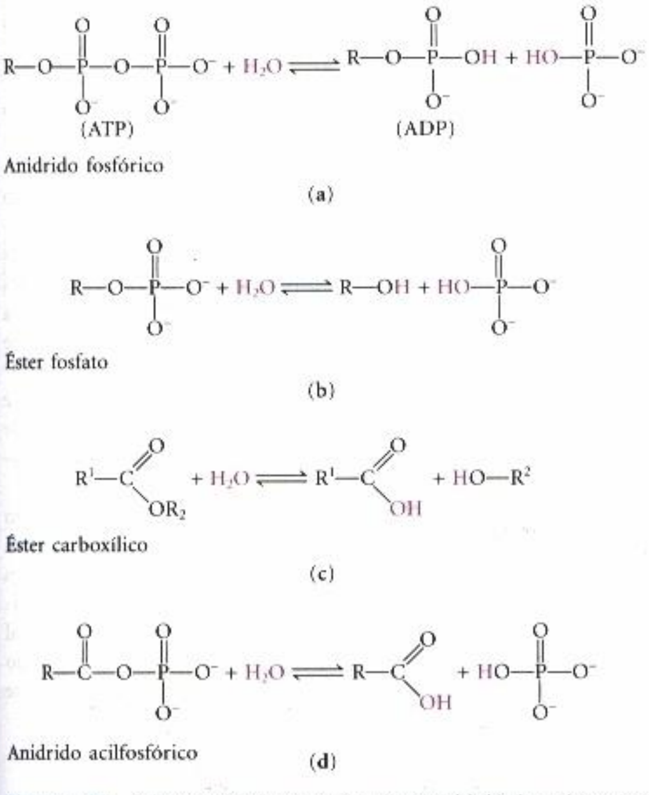


Figura 4-20 – Participação da água em reações biológicas. (**a**) O ATP é um fosfoanidrido formado pela reação de condensação (perda dos elementos da água) entre o ADP e o fosfato. R representa a adenosina monofosfato (AMP). Essa reação de condensação requer energia. A hidrólise (adição dos elementos da água) do ATP libera uma quantidade equivalente de energia. Também são mostradas algumas reações de condensação e hidrólise comuns nos sistemas biológicos (**b**), (**c**) e (**d**).

Você está (esperamos!) consumindo oxigênio à medida que lê este livro. A água e o dióxido de carbono são os produtos finais da oxidação dos combustíveis como a glicose. A reação geral desse processo pode ser resumida pela equação:

$$\underset{\text{Glicose}}{C_6H_{12}O_6} + 6O_2 \rightleftharpoons 6CO_2 + 6H_2O$$

A "água metabólica" assim formada a partir de alimentos sólidos e combustíveis estocados é suficiente para permitir a sobrevivência de alguns animais (esquilo da Mongólia, cangurus, ratos e camelos), em habitats muito secos, sem tomar água por longos períodos.

As plantas verdes e as algas verdes usam a energia luminosa do Sol para quebrar a água no processo da fotossíntese.

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + 2AH_2$$

Nessa reação, A é uma espécie de aceptora de prótons que varia com o tipo de organismo fotossintético.

A Adequação do Ambiente Aquoso para os Organismos Vivos

Os organismos têm-se adaptado efetivamente aos seus ambientes aquosos e desenvolvido maneiras de explorar as propriedades incomuns da água. O alto calor específico da água (a energia calorífica necessária para aumentar de 1°C a temperatura de um grama de água) é útil para as células e os organismos porque possibilita que a água atue como um "tampão de calor", permitindo que a temperatura de um organismo fique relativamente constante quando a temperatura do ar flutua e quando o calor é gerado como um produto colateral do metabolismo. Além disso, alguns vertebrados exploram o alto valor do calor de vaporização da água (Tabela 4-1), usando (portanto, perdendo) o excesso de calor corporal para evaporar o suor. O alto grau de coesão interna da água líquida, devido às pontes de hidrogênio, é explorado pelas plantas como um meio de transportar nutrientes dissolvidos das raízes até as folhas, durante o processo de transpiração. Até mesmo a densidade do gelo, menor que a da água líquida, tem conseqüências biológicas importantes nos ciclos vitais dos organismos aquáticos. Lagoas congelam-se da superfície para o fundo, e a camada de gelo na superfície isola a água abaixo do gelo do ar muito mais frio, impedindo que as lagoas (e os organismos que nela vivem) se congelem. De fundamental importância para todos os organismos vivos é o fato de que muitas propriedades físicas e biológicas das macromoléculas celulares, particularmente das proteínas e dos ácidos nucléicos, derivam da sua interação com as moléculas de água do meio ambiente circunvizinho. A influência da água no curso da evolução biológica tem sido intensa e determinante. Se formas de vida evoluíram em alguma outra parte do universo, é improvável que se assemelhem às da Terra, a menos que sua origem extraterrena também seja um local onde exista uma grande quantidade de água líquida.

O ambiente aquoso abriga miríades de espécies. Corais, esponjas, briozoários e algas competem pelo espaço disponível nos recifes das costas das Ilhas Filipinas.

Resumo

A água é o composto mais abundante nos organismos vivos. Os seus pontos de congelamento, ebulição e calor de vaporização relativamente altos são o resultado de atrações intermoleculares fortes na forma de pontes de hidrogênio entre moléculas de água adjacentes. A água líquida tem um considerável ordenamento de curta distância e consiste de agregados de curta duração, ligados por pontes de hidrogênio. A polaridade e a capacidade de formar pontes de hidrogênio fazem dela um potente solvente para muitos compostos iônicos e outras moléculas polares. Compostos não-polares, incluindo os gases CO_2, O_2 e N_2, são pouco solúveis na água.

Quatro tipos de interações fracas ocorrem dentro e entre as biomoléculas em um solvente aquoso: interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals e pontes de hidrogênio. Embora individualmente fracas, coletivamente criam fortes forças estabilizadoras para as proteínas, os ácidos nucléicos e as membranas. Interações fracas (não-covalentes) também estão no cerne da catálise enzimática, no funcionamento dos anticorpos e nas interações receptor-ligante.

Quando soluções aquosas de diferentes concentrações são separadas por uma membrana semipermeável, a água atravessa a membrana na direção da menor concentração de água. Esse movimento da água através da membrana semipermeável (osmose) cria uma pressão osmótica. Para células em soluções hipotônicas, a entrada de água através da membrana plasmática causa intumescência, produzindo uma pressão de turgor ou lise osmótica, se a célula não estiver protegida por uma parede rígida. As propriedades coligativas (pontos de fusão e ebulição, pressão de vapor e pressão osmótica) dependem do número de partículas dissolvidas (íons, moléculas), e não das suas massas moleculares ou propriedades químicas.

A água ioniza-se muito pouco para formar íons H^+ e OH^-. O rápido "salto" de prótons ao longo de uma seqüência de moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio dá a aparência de uma difusão de prótons na água, excepcionalmente rápida. Em soluções aquosas diluídas, as concentrações dos íons H^+ e OH^- são inversamente relacionadas pela expressão $K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14} M^2$ (a 25°C). A concentração do íon hidrogênio dos sistemas biológicos é geralmente expressa em termos de pH, definido como $pH = -\log [H^+]$.

Os ácidos são definidos como doadores de prótons, e as bases, como aceptores de prótons. Um par ácido-base conjugado consiste de um doador de prótons (HA) e seu correspondente aceptor de prótons (A^-). A tendência de um ácido HA doar prótons é expressa pela sua constante de dissociação ($K_a = [H^+][A^-]/[HA]$) ou pela função pK_a, definida como $-\log K_a$, que pode ser determinada por meio de uma curva de titulação. O pH de uma solução de ácido fraco está relacionado quantitativamente com o seu pK_a e com a razão das concentrações de suas espécies doadora e aceptora de prótons por meio da equação de Henderson-Hasselbalch.

Um par ácido-base conjugado pode agir como um tampão e resistir às variações de pH; sua capacidade para fazer isso é maior em um pH numericamente igual ao seu pK_a. Muitos tipos de biomoléculas têm grupos funcionais que contribuem para a capacidade tamponante. Proteínas, H_2CO_3/HCO_3^- e $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ são sistemas-tampão biologicamente importantes. A atividade catalítica das enzimas é fortemente influenciada pelo pH, e o ambiente onde elas funcionam devem ser tamponados contra grandes variações de pH.

A água não é apenas o solvente no qual ocorrem as reações metabólicas; ela participa diretamente em muitos processos bioquímicos, incluindo as reações de hidrólise e de condensação. As propriedades físicas e químicas da água são de importância central para a estrutura e a função biológicas. A evolução da vida na Terra foi influenciada em grande parte pelas suas propriedades de solvente e reagente.

Leitura Adicional

Geral

Denny MW. (1993) *Air and Water: The Biology and Physics of Life's Media*, Princeton University, Princeton, NJ.

Uma surpreendente investigação sobre a relevância biológica das propriedades da água.

Eisenberg D & Kauzmann W. (1969) *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press, New York.

Um estudo avançado da físico-química da água.

Franks F & Mathias SF (eds). (1982) *Biophysics of Water*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Uma extensa coleção de artigos sobre a estrutura da água pura e do citoplasma.

Gerstein M & Levitt M. (1998) Simulating water and the molecules of life. *Sci. Am.* **279** (November), 100-105.

Uma descrição bem ilustrada do uso da simulação em computador para estudar a associação biologicamente importante da água com proteínas e ácidos nucléicos.

Gronenborn A & Clore M. (1997) Water in and around proteins. *The Biochemist* 19 (3), 18-21.

Uma breve discussão sobre água ligada à proteína, detectada por cristalografia e RNM.

Kornblatt J & Kornblatt J. (1997) The role of water in recognition and catalysis by enzymes. *The Biochemist* 19 (3), 14-17.

Um breve e útil sumário dos métodos nos quais a água ligada influencia a estrutura e a atividade das proteínas.

Kuntz ID & Zipp A. (1977) Water in biological systems. *N. Engl. J. Med.* **297**, 262-266.

Uma breve revisão do estado físico da água, do citosol e de suas interações com biomoléculas dissolvidas.

Ladburry J. (1996) Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem. Biol.* **3**, 973-980.

Stillinger FH. (1980) Water revisited. *Science* **209**, 451-457.

Uma breve revisão da estrutura física da água, incluindo a importância das pontes de hidrogênio e a natureza da interação hidrofóbica.

Westhof E (ed). (1993) *Water and Biological Macromolecules*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Catorze capítulos, cada um de diferente autor, cobrindo (em nível avançado) a estrutura da água e suas interações com proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e lipídios.

Wiggins PM. (1990) Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* **54**, 432-449.

Uma revisão do papel da água na biologia, incluindo discussão da estrutura física da água líquida, sua interação com as biomoléculas e o estado da água nas células vivas.

Interações fracas nos sistemas aquosos

Fersht AR. (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 301-304.

Uma discussão quantitativa, clara e breve da contribuição das pontes de hidrogênio no reconhecimento molecular e na catálise enzimática.

Frieden E. (1975) Non-covalent interactions: key to biological flexibility and specificity. *J. Chem. Educ.* **52**, 754-761.

Revisão dos quatro tipos de interações que estabilizam as macromoléculas e conferem especificidade biológica, com exemplos claros.

Jeffrey GA. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York.

Uma discussão detalhada e avançada da estrutura e propriedades das pontes de hidrogênio, incluindo aquelas em água e biomoléculas.

Schwabe JWR. (1997) The role of water in protein-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 126-134.

Analisa o importante papel da água na especificidade e afinidade das interações proteína-DNA.

Tanford C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* **200**, 1012-1018.

Uma revisão das bases química e energética das interações hidrofóbicas entre biomoléculas em soluções aquosas.

Ácidos fracos, bases fracas e tampões: problemas para praticar

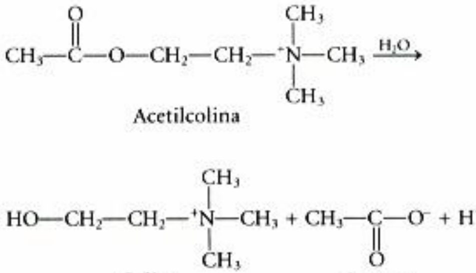
Segel IH. (1976) *Biochemical Calculations*, 2nd edn, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Problemas

1. Vinagre artificial. Uma maneira de fabricar vinagre (*não* a preferível) é preparar uma solução de ácido acético, o único componente ácido do vinagre, no pH apropriado (veja Fig. 4-13) e adicionar agentes flavorizantes adequados. O ácido acético (M_r 60) é um líquido a 25°C com densidade 1,049g/mL. Calcule o volume que deve ser adicionado à água destilada para fazer 1L de vinagre artificial (veja Fig. 4-14).

2. Acidez do HCl gástrico. Em um laboratório hospitalar, uma amostra de 10mL de suco gástrico, obtida várias horas após uma refeição, foi titulada com NaOH 0,1M até a neutralidade. Foram gastos 7,2mL de NaOH. Como o estômago do paciente não continha alimentos sólidos ou líquidos, pode-se considerar que não havia nenhum tampão presente na titulação. Qual é o pH do suco gástrico?

3. Medida dos níveis de acetilcolina por meio de variações do pH. A concentração de acetilcolina (um neurotransmissor) em uma amostra pode ser determinada pelas variações no pH que acompanham a sua hidrólise. Quando a amostra é incubada com a enzima acetilcolinesterase, a acetilcolina é quantitativamente convertida em colina e ácido acético que se dissocia liberando acetato e íon H^+:



$$CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-{}^{+}\underset{\underset{CH_3}{|}}{\overset{\overset{CH_3}{|}}{N}}-CH_3 \xrightarrow{H_2O}$$

Acetilcolina

$$HO-CH_2-CH_2-{}^{+}\underset{\underset{CH_3}{|}}{\overset{\overset{CH_3}{|}}{N}}-CH_3 + CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O^- + H^+$$

Colina

Acetato

Em uma análise típica, 15mL de uma solução aquosa contendo uma quantidade desconhecida de acetilcolina tinha pH de 7,65. Quando incubada com a acetilcolinesterase, o pH da solução diminuiu para 6,87. Considerando que não havia nenhum tampão na mistura de ensaio, determine o número de moles de acetilcolina nos 15mL da solução desconhecida.

4. Balanço osmótico em um sapo marinho. O sapo comedor de caranguejo, *Rana cancrivora*, do sudoeste da Ásia, nasce e cresce em água doce, mas procura por seu alimento em mangues pantanosos costeiros (que contêm 80% de água salgada). Conseqüentemente, quando o sapo se move da água doce para a água do mar, experimenta uma grande mudança na osmolaridade de seu ambiente (de hipotônico para hipertônico).

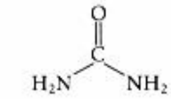
(a) A água do mar a 80% contém NaCl 460mM, KCl 10mM, $CaCl_2$ 10mM e $MgCl_2$ 50mM. Quais são as concentrações das várias espécies iônicas nessa água do mar? Considerando-se que esses sais representam praticamente quase todos os solutos na água do mar, qual é a osmolaridade dessa água?

(b) A tabela a seguir mostra a concentração citoplasmática dos íons no *Rana cancrivora*. Ignorando a presença de proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos e outros pequenos metabólitos dissolvidos, qual é a osmolaridade das células do sapo, baseando-se somente nas concentrações iônicas dadas na tabela?

	Na^+ (mM)	**K^+ (mM)**	**Cl^- (mM)**	**Ca^{2+} (mM)**	**Mg^{2+} (mM)**
Rana cancrivora	122	10	100	2	1

(c) Similarmente aos outros sapos, o sapo comedor de caranguejo pode trocar gases através da sua pele permeável, o que permite que ele fique sob a água por longos períodos, sem respirar. Como a alta permeabilidade da pele do sapo afeta suas células quando ele se move da água doce para a água do mar?

(d) O sapo comedor de caranguejo usa dois mecanismos para manter suas células em balanço osmótico com seu meio ambiente. Primeiro, permite que as concentrações de Na^+ e Cl^- aumentem vagarosamente, à medida que os íons difundem através de seus gradientes de concentração. Segundo, tal como muitos elasmobrânquios (tubarões), ele retém a uréia, um produto de excreção, em suas células. A adição de NaCl e uréia aumenta a osmolaridade do citosol até um valor aproximadamente igual ao do meio ambiente.



Uréia (CH_4N_2O)

Considerando que o volume de água em um sapo típico é 100mL, quantos gramas de NaCl (fórmula grama, (FG) 58,44) o sapo necessita para deixar seus tecidos isotônicos em relação à água do mar?

(e) Quantos gramas de uréia (FG 60) ele deve reter para realizar a mesma coisa?

5. Propriedades de um tampão. O aminoácido glicina é freqüentemente empregado como o principal ingrediente de um tampão em experimentos bioquímicos. O grupo amino da glicina, que possui um pK_a de 9,6, pode existir tanto na forma protonada ($—NH_3^+$) como na forma de base livre ($—NH_2$) devido ao equilíbrio reversível:

$$R{-}NH_3^+ \rightleftharpoons R{-}NH_2 + H^+$$

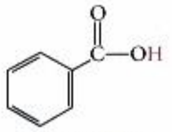
(a) Em que intervalo de pH a glicina pode ser empregada como um tampão efetivo devido a seu grupo amino?

(b) Em uma solução de glicina 0,1M e em pH 9, que fração de glicina possui seu grupamento amino na forma $—NH_3^+$?

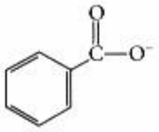
(c) Que volume de KOH 5M deve ser adicionado a 1L de glicina 0,1M em pH 9, para trazer o pH de volta para o valor 10?

(d) Quando 99% de glicina na forma de $—NH_3^+$, qual é a relação numérica entre o pH da solução e o pK_a do grupo amino?

6. O efeito do pH na solubilidade. A sua natureza polar e a propriedade de formar pontes de hidrogênio tornam a água um excelente solvente para as espécies iônicas (carregadas) dissolvidas. Contrariamente, as moléculas orgânicas não-ionizadas e não-polares, como o benzeno, são relativamente insolúveis em água. Em princípio, a solubilidade de todos os ácidos e bases orgânicos em água pode ser aumentada pela conversão das moléculas em espécies carregadas. Por exemplo, a solubilidade do ácido benzóico em água é pequena. A adição de bicarbonato de sódio eleva o pH da solução e o ácido benzóico dissocia-se formando o íon benzoato, que é muito solúvel em água.

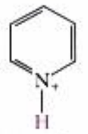


Ácido benzóico
$pK_a \approx 5$



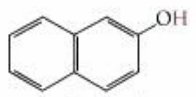
Íon benzoato

Os compostos mostrados a seguir são mais solúveis em solução aquosa de NaOH 0,1M ou de HCl 0,1M? (Os prótons dissociáveis são mostrados em vermelho.)



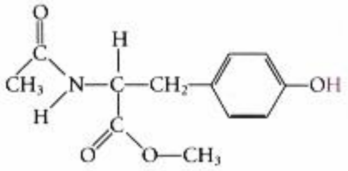
Íon piridina
$pK_a \approx 5$

(a)



β-naftol
$pK_a \approx 10$

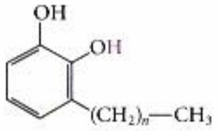
(b)



N-acetiltirosina metil éster
$pK_a \approx 10$

(c)

7. Tratamento do exantema provocado pela hera venenosa. Os catecóis substituídos que apresentam longas cadeias alquílicas são os componentes da substância irritante produzida pela hera venenosa e pelo carvalho venenoso, e, quando em contato com a pele, produzem um exantema característico.



$pK_a \approx 8$

Se você fosse exposto à hera venenosa, qual dos tratamentos a seguir você aplicaria à área afetada? Justifique sua escolha.

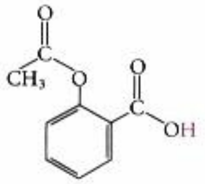
(a) Lavar a área com água fria.

(b) Lavar a área com vinagre diluído ou suco de limão.

(c) Lavar a área com água e sabão.

(d) Lavar a área com água, sabão e bicarbonato de sódio.

8. O pH e a absorção de drogas. A aspirina é um ácido fraco cujo pK_a é 3,5.



Ela é absorvida pelo sangue através das células que cobrem a superfície do estômago e intestino delgado. A absorção requer a passagem através da membrana plasmática e a sua velocidade é determinada pela polaridade da molécula: as moléculas carregadas e altamente polares atravessam a membrana vagarosamente, enquanto as hidrofóbicas neutras atravessam-na rapidamente. O pH do suco gástrico é da ordem de 1,5 e o pH do intestino delgado é cerca de 6. A aspirina é absorvida pela corrente sangüínea a partir do estômago ou do intestino delgado? Justifique claramente sua resposta.

9. Preparo de uma solução-tampão padrão para a calibração de um pHmetro. O elétrodo de vidro usado nos pHmetros comerciais fornece uma resposta elétrica proporcional à concentração do íons hidrogênio. Para converter essas respostas em pH, os elétrodos de vidro devem ser calibrados com uma solução-tampão padrão cuja concentração de H^+ é conhecida. Determine a massa, em gramas, do fosfato diácido de sódio (NaH_2PO_4; H_2O; FG 138,01) e a do fosfato monoácido de sódio (Na_2HPO_4; FG 141,98) necessária para preparar 1L de um tampão-padrão de pH 7, com uma concentração total de fosfato de 0,1M (veja Fig. 4-14).

10. Controle do pH do sangue pela velocidade da respiração

(a) A pressão parcial do CO_2 nos pulmões pode variar rapidamente por meio da velocidade e da profundidade da respiração. Por exemplo, uma providência comum para aliviar soluços é aumentar a concentração de CO_2 nos pulmões. Isso pode ser conseguido pela suspensão da respiração ou por meio de uma respiração muito vagarosa e superficial (hipoventilação) ou respirando dentro de um saco de papel. Em tais condições, a pressão parcial do CO_2 no espaço aéreo dos pulmões aumenta acima do normal. Explique qualitativamente o efeito desses procedimentos no pH sangüíneo.

(b) Uma prática comum dos atletas especialistas em corridas de curta distância é respirar rápida e profundamente (hiperventilação) por cerca de meio minuto para remover o CO_2 dos pulmões, imediatamente antes de uma arremetida de 100m. O pH do sangue pode subir até 7,6. Explique por que o pH do sangue sobe.

(c) Durante uma corrida de curta distância, os músculos produzem uma grande quantidade de ácido láctico ($CH_3CH(OH)COOH$, $K_a = 1,38 \times 10^{-4}$) a partir de seus estoques de glicose. Em vista desse fato, por que uma hiperventilação pode ser útil antes da corrida?

CAPÍTULO 5

Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Elas ocorrem em todas as células e em todas as partes destas. As proteínas também ocorrem em grande variedade; milhares de diferentes tipos, desde peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros com pesos moleculares na faixa de milhões, podem ser encontrados em uma única célula. Ainda mais, as proteínas também exibem uma grande diversidade de **funções biológicas**, sendo os produtos finais mais importantes das vias de informação, discutidas na Parte IV deste livro. Em um sentido, elas são os instrumentos moleculares por meio dos quais a informação genética é expressa. Assim, é apropriado começar o estudo das macromoléculas biológicas pelas proteínas, cujo nome vem da palavra grega *protos* que significa "a primeira" ou a "mais importante".

As suas subunidades monoméricas relativamente simples fornecem a chave para a estrutura de milhares de proteínas diferentes. Todas as proteínas, sejam das linhagens mais antigas de bactérias, sejam das formas mais complexas de vida, são construídas com o mesmo ubíquo conjunto de 20 aminoácidos, ligados covalentemente em seqüências lineares características. Em virtude de cada um desses aminoácidos ter uma cadeia lateral distintiva, a qual determina as suas propriedades químicas, esse grupo de 20 moléculas precursoras pode ser considerado como o alfabeto com o qual a linguagem da estrutura protéica é escrita.

O mais notável é que as células podem produzir proteínas com propriedades e atividades extraordinariamente diferentes, pela reunião dos mesmos 20 aminoácidos em muitas combinações e seqüências diversas. A partir desses blocos formadores, os diferentes organismos podem sintetizar produtos largamente diferentes entre si, como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, músculos, proteínas do cristalino do olho, penas de pássaros, teias de aranha, chifres de rinoceronte, proteínas do leite, antibióticos, venenos de fungos e uma miríade de outras substâncias, cada uma delas exibindo atividades biológicas características (Fig. 5-1). Entre esses produtos protéicos, as enzimas são os que apresentam maior variedade e especialização. Virtualmente, todas as reações celulares são catalisadas por enzimas.

A estrutura e a função das proteínas é o tópico para este e os próximos três capítulos. Iniciaremos com uma descrição das propriedades químicas fundamentais de aminoácidos, peptídeos e proteínas.

Aminoácidos

As proteínas são polímeros resultantes da desidratação de aminoácidos, e cada **resíduo de aminoácido** liga-se a seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente. (O termo "resíduo" reflete a perda dos elementos químicos da água, quando um aminoácido é unido a outro.) As proteínas podem ser reduzidas a seus aminoácidos constituintes (hidrolisadas) por uma variedade de métodos, e os primeiros estudos sobre as proteínas focalizaram, naturalmente,

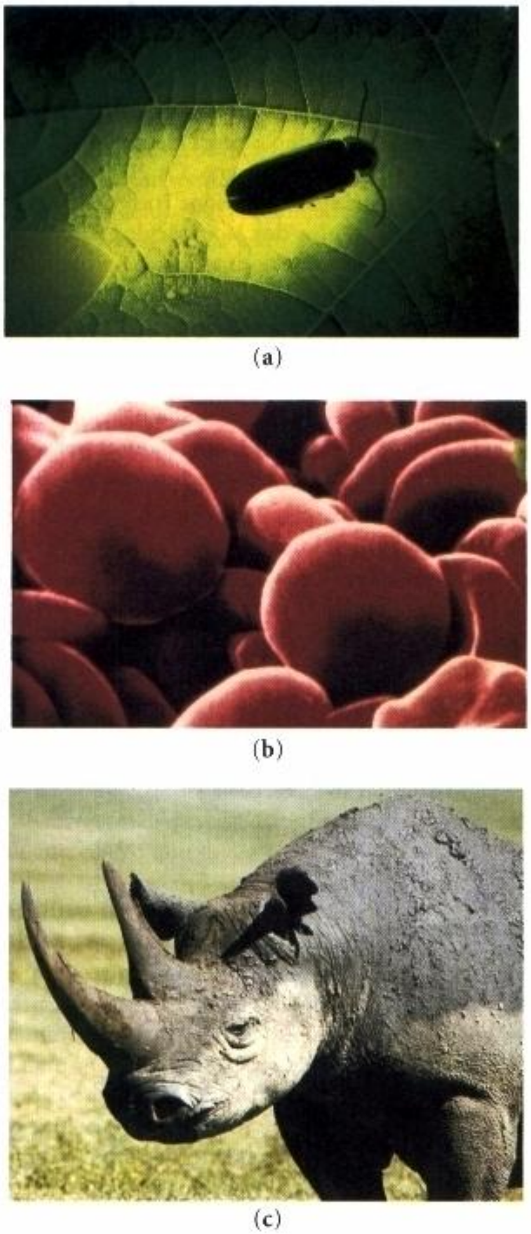


Figura 5-1 – Algumas funções das proteínas. (**a**) A luz produzida por vaga-lumes é resultante de uma reação que envolve a proteína luciferina e o ATP; essa reação é catalisada pela enzima luciferase (veja Adendo 14-3). (**b**) Os eritrócitos contêm grandes quantidades da proteína transportadora de oxigênio, a hemoglobina. (**c**) A proteína queratina é produzida por todos os animais vertebrados. Ela é o principal componente estrutural de cabelo, unhas, chifres, lã, escamas e penas. O rinoceronte negro selvagem está em extinção, em virtude dos mitos existentes em algumas partes do mundo de que o pó obtido de seus chifres tem propriedades afrodisíacas. Na realidade, suas propriedades químicas não diferem em nada das do pó obtido dos chifres bovinos ou das unhas humanas.

os aminoácidos delas derivados. O primeiro aminoácido descoberto nas proteínas foi a asparagina, em 1806. O último dos 20, a treonina, somente foi identificado em 1938. Todos os aminoácidos têm nomes triviais ou comuns; em alguns casos, esses nomes triviais foram retirados da fonte de que foram isolados pela primeira vez. A asparagina foi encontrada primeiramente no aspargo; o ácido glutâmico foi encontrado no glúten do trigo; a tirosina foi isolada primeiro do queijo (assim, o seu nome é derivado da palavra grega *tyros*, "queijo"). A glicina (do grego *glykos*, "doce") foi, assim, nomeada em virtude de seu sabor adocicado.

Os aminoácidos têm características estruturais comuns

Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas são α-aminoácidos. Eles têm um grupo carboxila e um grupo amino, ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α) (Fig. 5-2). Diferem entre si por suas cadeias laterais ou **grupos R**, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água. Os 20 aminoácidos das proteínas são freqüentemente referidos como os aminoácidos primários para distingui-los dos aminoácidos menos comuns, que são resíduos modificados no interior das proteínas, depois que estas são sintetizadas, e de muitos outros tipos de aminoácidos presentes nos organismos vivos, porém não nas proteínas. Os aminoácidos primários, por convenção internacional, têm sido designados por abreviações de três letras (derivadas de seus nomes na língua inglesa) ou por um símbolo de uma única letra (Tabela 5-1); ambos usados como abreviaturas para indicar a composição e a seqüência dos aminoácidos nas proteínas.

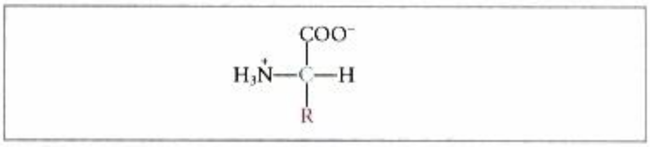
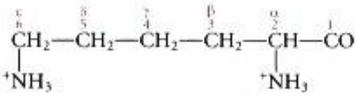

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{R}{\overset{COO^-}{C}}-H$$

Figura 5-2 – Estrutura geral dos aminoácidos encontrados em proteínas. Esta estrutura é comum a todos os α-aminoácidos das proteínas, exceto um (a prolina, um aminoácido cíclico, é a exceção). O grupo R ou cadeia lateral (em vermelho) ligado ao carbono α (em azul) é diferente em cada um dos aminoácidos.

Duas convenções, que acarretam na prática uma certa confusão, são utilizadas para identificar os carbonos de um aminoácido. Os carbonos adicionais em um grupo R são designados por β, γ, δ, ε etc. e, assim, são nomeados a partir do carbono α. Para a maioria das outras moléculas orgânicas, os átomos de carbono são simplesmente numerados a partir de uma extremidade, com maior prioridade para os carbonos com substituintes que contêm do átomos com os números atômicos mais elevados. Por esta última convenção, o grupo carboxila de um aminoácido seria C-1, e o carbono α, C-2. Em alguns casos, tais como nos aminoácidos com grupos R heterocíclicos, o sistema que utiliza letras gregas é ambíguo, por esse motivo, utiliza-se a convenção numérica.


$$\underset{^+NH_3}{\overset{\overset{\varepsilon}{6}}{C}H_2}-\overset{\overset{\delta}{5}}{C}H_2-\overset{\overset{\gamma}{4}}{C}H_2-\overset{\overset{\beta}{3}}{C}H_2-\underset{^+NH_3}{\overset{\overset{\alpha}{2}}{C}H}-\overset{1}{C}OO^-$$

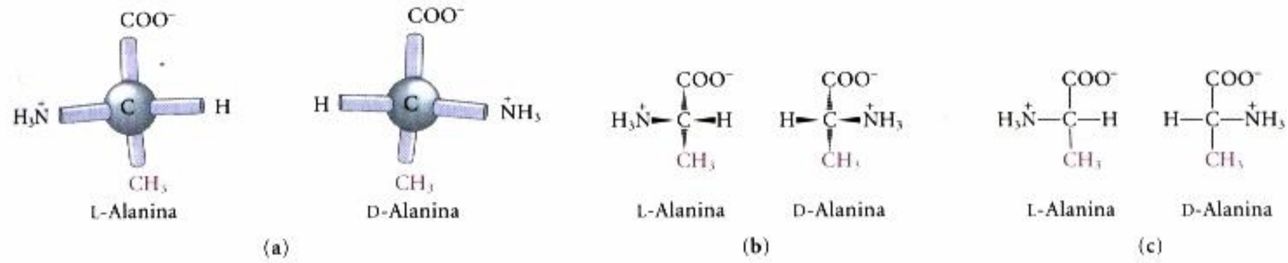
Lisina

Tabela 5-1 – Propriedades e convenções associadas com os aminoácidos primários

Aminoácido	Nomes abreviados		M_r	Valores de pK_a pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH_3^+)	pK_R (grupo R)	pI	Índice hidropático*	Ocorrência nas proteínas (%)[†]
Grupos R alifáticos, não-polares									
Glicina	Gly	G	75	2,34	9,60		5,97	–0,4	7,2
Alanina	Ala	A	89	2,34	9,69		6,01	1,8	7,8
Prolina	Pro	P	115	1,99	10,96		6,48	1,6	5,2
Valina	Val	V	117	2,32	9,62		5,97	4,2	6,6
Leucina	Leu	L	131	2,36	9,60		5,98	3,8	9,1
Isoleucina	Ile	I	131	2,36	9,68		6,02	4,5	5,3
Metionina	Met	M	149	2,28	9,21		5,74	1,9	2,3
Grupos R aromáticos									
Fenilalanina	Phe	F	165	1,83	9,13		5,48	2,8	3,9
Tirosina	Tyr	Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	–1,3	3,2
Triptofano	Trp	W	204	2,38	9,39		5,89	–0,9	1,4
Grupos R não-carregados, mas polares									
Serina	Ser	S	105	2,21	9,15		5,68	–0,8	6,8
Treonina	Thr	T	119	2,11	9,62		5,87	–0,7	5,9
Cisteína	Cys	C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	1,9
Asparagina	Asn	N	132	2,02	8,80		5,41	–3,5	4,3
Glutamina	Gln	Q	146	2,17	9,13		5,65	–3,5	4,2
Grupos R carregados positivamente									
Lisina	Lys	K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	–3,9	5,9
Histidina	His	H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	–3,2	2,3
Arginina	Arg	R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	–4,5	5,1
Grupos R carregados negativamente									
Aspartato	Asp	D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	–3,5	5,3
Glutamato	Glu	E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	–3,5	6,3

* Uma escala que combina hidrofobicidade e hidrofilia dos grupos R pode ser empregada para predizer quais aminoácidos serão encontrados em um ambiente aquoso (valores negativos) ou em um ambiente hidrofóbico (valores positivos). Veja Capítulo 12. Retirado de Kyte J & Doolittle RF. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

[†] Ocorrência média calculada empregando-se valores de mais de 1.150 proteínas. Retirado de Doolittle RF. (1989) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman GD, ed), Plenum Press, NY, pp. 599-623.

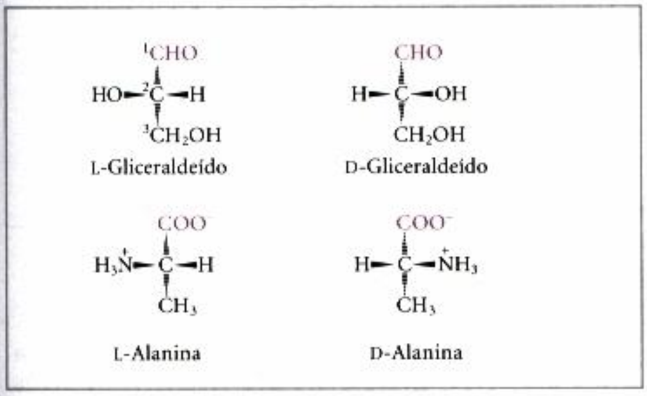


L-Alanina D-Alanina (a) L-Alanina D-Alanina (b) L-Alanina D-Alanina (c)

Figura 5-3 – Estereoisomeria nos α-aminoácidos. (**a**) Os dois estereoisômeros da alanina, L e D-alanina, são imagens especulares não-superponíveis (enantiômeros). (**b**) e (**c**) Duas convenções diferentes para mostrar as configurações espaciais dos estereoisômeros. Nas fórmulas em perspectiva (**b**), as ligações em forma de cunha projetam-se para a frente do plano do papel, as ligações representadas por linhas pontilhadas projetam-se para trás deste plano. Nas fórmulas em projeção (**c**), as ligações horizontais são assumidas como projetadas para a frente do plano do papel, as ligações verticais, para a parte de trás deste plano. Entretanto, as fórmulas em projeção são freqüentemente usadas ao acaso, sem intenção de exibir uma configuração estereoquímica específica.

Para todos os aminoácidos primários, exceto a glicina, o carbono α liga-se a quatro grupos substituintes diferentes: um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio (Fig. 5-2; na glicina, o grupo R é outro átomo de hidrogênio). O átomo de carbono α é, assim, um **centro quiral** (veja Fig. 3-9). Por causa do arranjo tetraédrico das orbitais de ligação ao redor do carbono α dos aminoácidos, os quatro diferentes grupos substituintes podem ocupar duas disposições espaciais distintas, e estas são, entre si, imagens especulares não-superponíveis (Fig. 5-3). Essas duas formas representam uma classe de **estereoisômeros**, chamada de **enantiômeros** (veja Fig. 3-10). Todas as moléculas com centros quirais são também **opticamente ativas**, isto é, podem girar a luz plano-polarizada (veja Adendo 3-1).

Uma nomenclatura especial foi desenvolvida para especificar a **configuração absoluta** dos quatro substituintes no átomo de carbono assimétrico. As configurações absolutas de açúcares simples e aminoácidos são especificadas pelo **sistema D, L** (Fig. 5-4), baseado na configuração absoluta do açúcar de três carbonos, o gliceraldeído. Essa convenção foi proposta por Emil Fischer em 1891. (Fischer conhecia os grupos em torno do carbono assimétrico do gliceraldeído, mas não tinha idéia de sua configuração absoluta; sua suposição foi mais tarde confirmada por análises de difração de raios X). Para todos os compostos quirais, os estereoisômeros com configuração semelhante à do L-gliceraldeído são denominados L, e os estereoisômeros assemelhados ao D-gliceraldeído são designados D. Os grupos funcionais da L-alanina assemelham-se aos do L-gliceraldeído, podendo ser convertidos um no outro por reações químicas. Assim, o grupo carboxila da L-alanina ocupa a mesma posição em torno do átomo de carbono quiral que o grupo aldeído do L-gliceraldeído, e um aldeído pode ser facilmente convertido (oxidado) em um grupo carboxila. Historicamente, as designações semelhantes *l* e *d* foram usadas para levorrotatório (provoca a rotação da luz para a esquerda) e dextrorrotatório (provoca a rotação da luz para a direita) (veja Adendo 3-1). Entretanto, nem todos os L-aminoácidos são levorrotatórios, e a convenção mostrada na Figura 5-4 foi necessária para se evitar possíveis ambigüidades com respeito à configuração absoluta. Pela convenção de Fischer, L e D referem-se *apenas* à configuração absoluta dos quatro substituintes em torno do carbono quiral.



L-Gliceraldeído D-Gliceraldeído

L-Alanina D-Alanina

Figura 5-4 – Relacionamento estérico entre os estereoisômeros de alanina e a configuração absoluta do L e D-gliceraldeído. Nestas fórmulas em perspectiva, os carbonos são alinhados verticalmente, com o átomo quiral no centro. Os carbonos nessas moléculas são numerados, iniciando-se pelo grupo aldeído ou carboxila de uma extremidade (em vermelho), de 1 a 3, de cima para baixo, conforme mostrado. Quando apresentado dessa forma, o grupo R do aminoácido (neste caso, o grupo metila da alanina) está sempre abaixo do carbono α. Os L-aminoácidos são os que apresentam o grupo α-amino à esquerda e os D-aminoácidos os que o têm à direita.

Outro sistema para especificar a configuração em torno de um centro quiral é o **sistema RS** (explicado no Capítulo 3), que é usado na nomenclatura sistemática de química orgânica e descreve de forma mais precisa a configuração de moléculas com mais de um centro quiral.

Os resíduos de aminoácidos nas proteínas são L-estereoisômeros

Quase todos os compostos biológicos com centro quiral ocorrem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica, D ou L. Os aminoácidos nas moléculas protéicas são sempre L-estereoisômeros. Os D-aminoácidos foram encontrados apenas em pequenos peptídeos da parede de células bacterianas e em alguns peptídeos que agem como antibióticos.

É notável que os aminoácidos das proteínas sejam todos L-estereoisômeros. Como observamos no Capítulo 3, quando compostos quirais são formados por reações químicas comuns, resulta uma mistura racêmica dos isômeros D e L. Embora as formas D e L de moléculas quirais sejam difíceis de ser diferenciadas e isoladas por um químico, para um sistema vivo, são tão diferentes como a mão direita e a esquerda. A formação de subestruturas repetitivas estáveis nas proteínas (Capítulo 6) requer, geralmente, que seus aminoácidos constituintes pertençam a uma série estereoquímica. As células podem sintetizar especificamente os isômeros L dos aminoácidos, porque os sítios ativos das enzimas são assimétricos, o que leva à estereoespecificidade das reações por eles catalisadas.

Os aminoácidos podem ser classificados pelos seus grupos R

Uma boa compreensão das propriedades químicas dos aminoácidos primários é fundamental para o entendimento de grande parte da bioquímica. Este tópico pode ser simplificado pelo agrupamento dos aminoácidos em cinco classes principais, tendo como base as propriedades dos seus grupos R (Tabela 5-1, p. 90), em particular sua **polaridade**, ou tendência para interagir com a água em pH biológico (pH próximo a 7). A polaridade dos grupos R varia amplamente, desde um comportamento totalmente não-polar ou hidrofóbico (insolúvel em água) até um altamente polar ou hidrofílico (solúvel em água).

As estruturas dos 20 aminoácidos primários são mostradas na Figura 5-5 e muitas de suas propriedades estão elencadas na Tabela 5-1. Em cada classe, existe uma graduação de tamanho, polaridade e forma dos grupos R.

Grupos R não-polares e alifáticos. Os grupos R nessa classe de aminoácidos são hidrofóbicos e não-polares. As volumosas cadeias laterais de **alanina, valina, leucina** e **isoleucina**, com suas formas características, são importantes na estabilização da estrutura das proteínas pela promoção de interações hidrofóbicas em seu interior. A **glicina** é o aminoácido de estrutura mais simples. Embora seja formalmente apolar, sua cadeia lateral, muito diminuta, não contribui efetivamente para a existência de interações hidrofóbicas. A **metionina**, um dos dois aminoácidos que contêm enxofre, possui um grupo tioéter em sua cadeia lateral. A prolina possui uma estrutura cíclica distintiva. O grupo amino secundário (imino) dos resíduos de Pro é mantido em uma conformação rígida que leva à redução na flexibilidade estrutural de regiões polipeptídicas que contêm prolina.

Grupos R aromáticos. A **fenilalanina**, a **tirosina** e o **triptofano**, com suas cadeias laterais aromáticas, são relativamente apolares (hidrofóbicos). Todos podem participar de interações hidrofóbicas. O grupo hidroxila da tirosina pode formar pontes de hidrogênio e, por isso, atua como um grupo funcional importante na atividade de algumas enzimas. A tirosina e o triptofano são significativamente mais polares que a fenilalanina, em virtude do grupo hidroxila da tirosina e do nitrogênio do anel indol do triptofano.

O triptofano, a tirosina e, com menor intensidade, a fenilalanina absorvem luz na região ultravioleta do espectro (Fig. 5-6

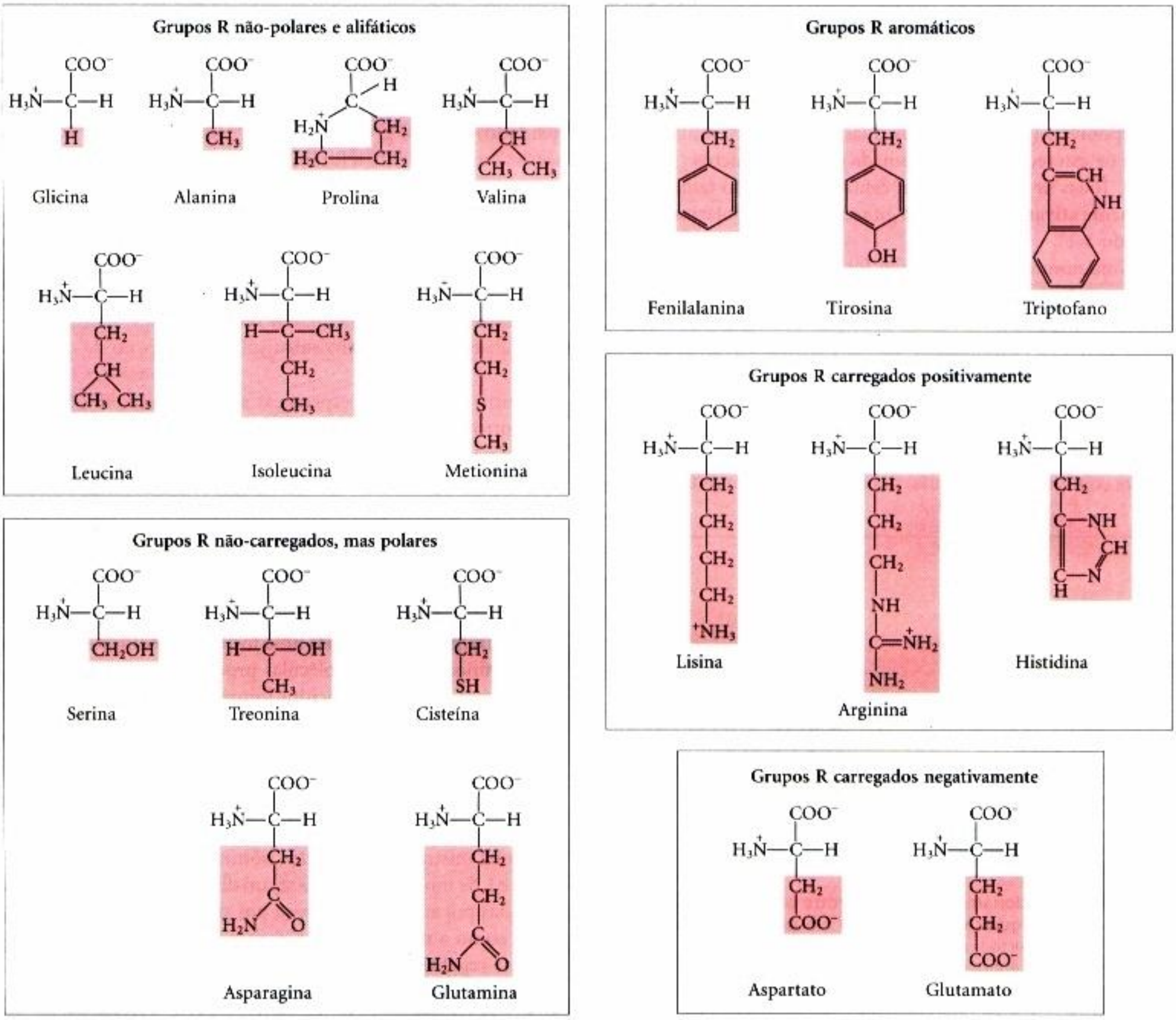

Grupos R não-polares e alifáticos
Glicina
Alanina
Prolina
Valina
Leucina
Isoleucina
Metionina
Grupos R aromáticos
Fenilalanina
Tirosina
Triptofano
Grupos R não-carregados, mas polares
Serina
Treonina
Cisteína
Asparagina
Glutamina
Grupos R carregados positivamente
Lisina
Arginina
Histidina
Grupos R carregados negativamente
Aspartato
Glutamato

Figura 5-5 – Os 20 aminoácidos primários das proteínas. As fórmulas estruturais mostram o estado de ionização que predomina em pH 7. As partes não-sombreadas são comuns a todos os aminoácidos; as áreas sombreadas em vermelho são os grupos R. Embora o grupo R da histidina seja mostrado como sendo não-carregado, seu pK_a (veja Tabela 5-1) indica que uma pequena, mas significativa, fração desses grupos está positivamente carregada em pH 7.

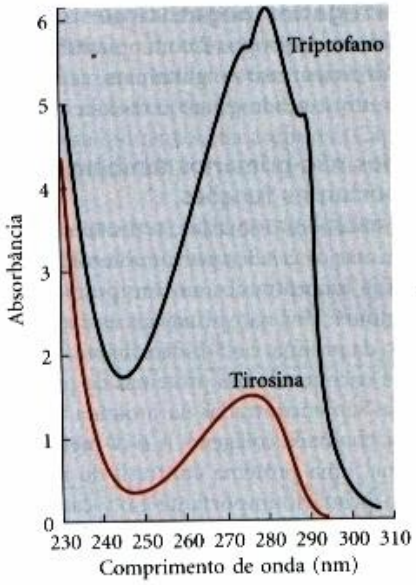


Figura 5-6 – Absorbância da luz ultravioleta pelos aminoácidos aromáticos. Comparação entre os espectros de absorção da luz dos aminoácidos aromáticos triptofano e tirosina em pH 6. Os aminoácidos estão presentes em quantidades equimolares (10^{-3}M) e em idênticas condições. A absorção da luz do triptofano é quatro vezes maior que a da tirosina. Note que o máximo de absorção para o triptofano e a tirosina ocorre em comprimentos de onda próximos a 280nm. A absorção de luz pelo terceiro aminoácido aromático, fenilalanina (não mostrada), geralmente pouco contribui para as propriedades de absorção luminosa das proteínas.

e Adendo 5-1). Esse fato é responsável pela forte e característica absorbância da luz pelas proteínas no comprimento de onda de 280nm, propriedade muito explorada pelos pesquisadores na caracterização de proteínas.

Grupos R não-carregados, mas polares. Os grupos R desses aminoácidos são mais solúveis em água, ou hidrofílicos, que os dos aminoácidos não-polares, porque contêm grupos funcionais que formam pontes de hidrogênio com a água. Essa classe de aminoácidos inclui **serina**, **treonina**, **cisteína**, **asparagina** e **glutamina**. A polaridade da serina e da treonina é devida a seus respectivos grupos hidroxila; a da cisteína, a seu grupo sulfidrila; e a da asparagina e da glutamina, a seus grupos amida.

Asparagina e glutamina são amidas de dois outros aminoácidos também encontrados em proteínas, aspartato e glutamato, respectivamente, aos quais são facilmente hidrolisadas por ácidos ou bases. A cisteína é facilmente oxidada para formar um aminoácido dimérico, unido covalentemente, chamado de **cistina**, no qual duas moléculas de cisteína estão unidas por uma ligação dissulfeto (Fig. 5-7). Os resíduos unidos por ligações dissulfeto são fortemente hidrofóbicos (apolares). As ligações dissulfeto têm um importante papel na estabilização de estruturas de muitas proteínas, em virtude da formação de ligações covalentes entre diferentes partes de uma molécula protéica ou entre duas cadeias protéicas distintas.

Adendo 5-1

Absorção da luz pelas moléculas: a lei de Lambert-Beer

Diversas biomoléculas absorvem a luz em comprimentos de onda característicos, como é o caso do triptofano, que absove a luz com comprimento de onda de 280nm (Fig. 5-6). A medida da absorção da luz, por meio de um espectrofotômetro, é usada para detectar e identificar moléculas, bem como medir suas concentrações em solução. A fração da luz incidente absorvida por uma solução em um dado comprimento de onda está relacionada com a espessura da camada absorvente (passo óptico) e a concentração das espécies que absorvem a luz (Fig. 1). Essas duas relações estão combinadas na lei de Lambert-Beer:

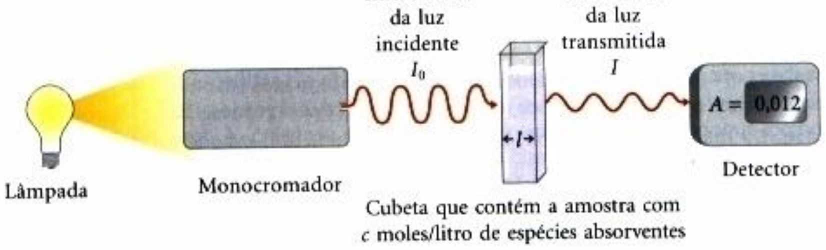
$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

onde I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade da luz transmitida, ε é o coeficiente de absorção molar (em unidades de litros/moles-centímetro), c é a concentração das espécies absorventes (em moles/litro), l é a espessura da camada (em centímetros) da amostra que absorve luz. A lei de Lambert-Beer assume que a luz incidente é um feixe paralelo e monocromático (com um único comprimento de onda) e que as moléculas do solvente e do soluto estão orientadas inteiramente ao acaso. A expressão log (I_0/I) é denominada **absorbância** da amostra e designada por A.

É importante notar que cada milímetro de passo óptico da solução absorvente, em uma célula de 1cm, absorve não uma quantidade constante, mas uma fração constante da luz incidente. Entretanto, com uma espessura fixa da camada absorvente, *a absorbância A é diretamente proporcional à concentração do soluto absorvente.*

O coeficiente de absorção molar varia com a natureza do composto absorvente, com o solvente e com o comprimento de onda e, também, com o pH da solução, se a espécie absorvente de luz está em equilíbrio com um estado de ionização que possua um espectro de absorção diferente.

Figura 1 – Os componentes principais de um espectrofotômetro. Uma fonte de luz emite luz com diversos comprimentos de onda. O monocromador seleciona e transmite a luz em um determinado comprimento de onda. A luz monocromática atravessa a amostra contida em uma cubeta de passo óptico l e é absorvida pela amostra proporcionalmente à concentração das espécies absorventes. A intensidade da luz transmitida é medida por um detector.


Intensidade da luz incidente I_0
Intensidade da luz transmitida I
$A = 0{,}012$
l
Lâmpada
Monocromador
Detector
Cubeta que contém a amostra com c moles/litro de espécies absorventes

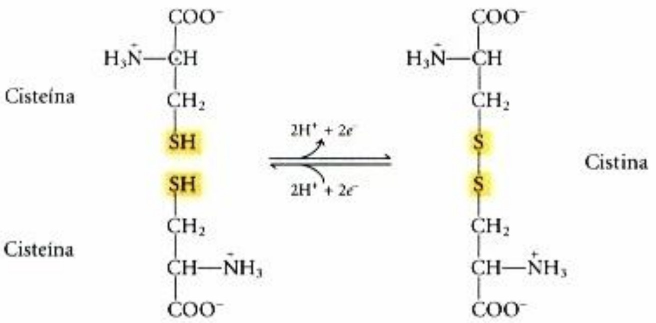


Figura 5-7 – A formação reversível de uma ligação dissulfeto pela oxidação de duas moléculas de cisteína. As ligações dissulfeto entre os resíduos de Cys estabilizam as estruturas de muitas proteínas.

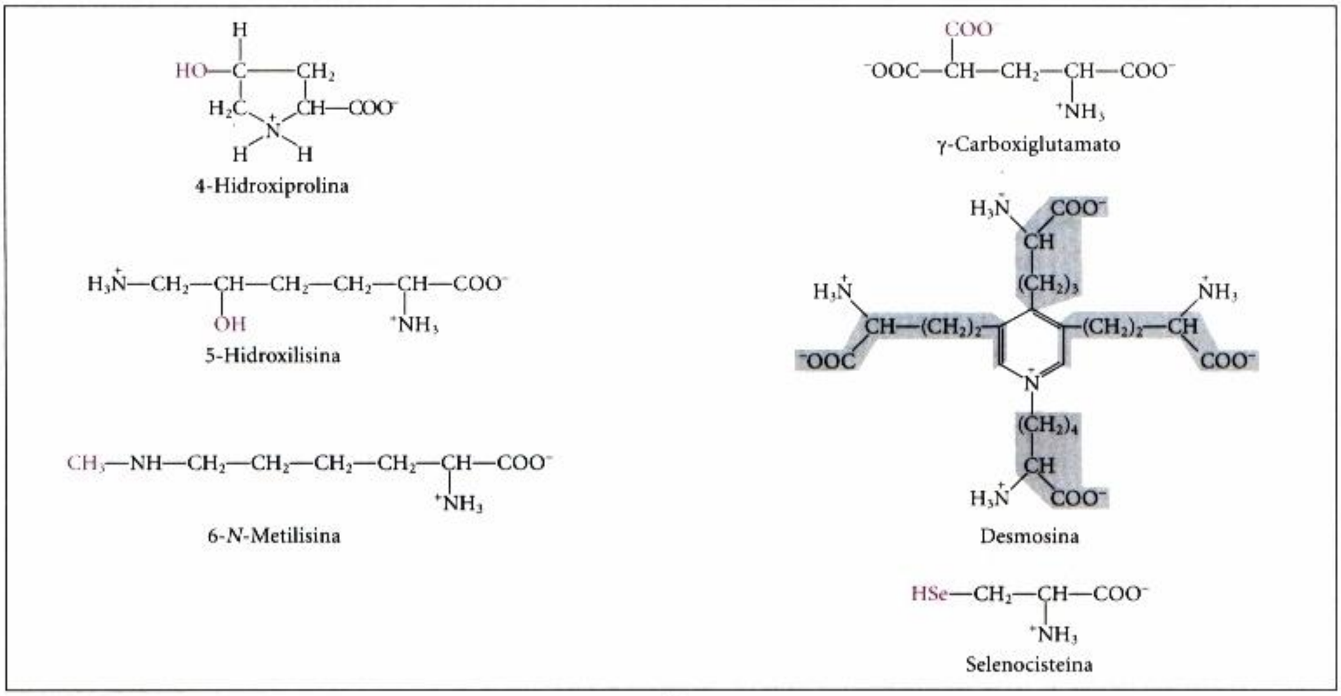
Grupos R carregados positivamente (básicos). Os grupos R mais hidrofílicos são aqueles que são positiva ou negativamente carregados. Os aminoácidos nos quais os grupos R têm uma carga positiva líquida em pH 7 são a **lisina**, a qual tem um segundo grupo na posição ε da sua cadeia alifática; a **arginina**, a qual tem um grupo carregado positivamente, o grupo guanidino; a **histidina**, que contém um grupo imidazol. A histidina é o único aminoácido primário que possui uma cadeia lateral com um pK_a próximo da neutralidade. Em muitas reações catalisadas por enzimas, um resíduo de histidina facilita a reação ao servir como doador ou aceptor de prótons.

Grupos R carregados negativamente (ácidos). Os dois aminoácidos, tendo grupos R com uma carga líquida negativa em pH 7, são o **aspartato** e o **glutamato**; cada um deles possui na molécula um segundo grupo carboxila.

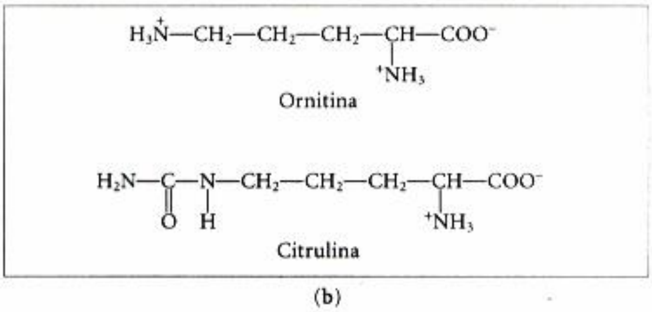
Os aminoácidos não-primários também possuem importantes funções

Além dos 20 aminoácidos primários, as proteínas podem conter resíduos não-primários criados por uma modificação dos resíduos primários já incorporados em um polipeptídeo (Fig. 5-8a). Entre os aminoácidos não-primários está a **4-hidroxiprolina**, um derivado da prolina, e a **5-hidroxilisina**, derivada da lisina. A primeira é encontrada nas proteínas da parede celular de vegetais, e ambas são encontradas na proteína fibrosa dos tecidos conjuntivos, chamada colágeno. A **6-*N*-metilisina** é encontrada na miosina, uma proteína contrátil do músculo. Outro aminoácido não-primário importante é o **γ-carboxiglutamato**, encontrado na protrombina, uma proteína importante na coagulação do sangue, bem como em certas proteínas que se ligam a íons Ca^{2+} durante sua função biológica. Mais complexo é o aminoácido **desmosina**, um derivado de quatro resíduos separados de lisina, encontrado na proteína elastina.

A **selenocisteína** é um caso especial. Esse resíduo pouco freqüente é introduzido durante a síntese protéica, em vez de ser criado por uma modificação pós-sintética. Ele contém selênio em lugar de enxofre da cisteína. Derivado na verdade da serina, a selenocisteína é um constituinte de algumas poucas proteínas conhecidas.



(a)



(b)

Figura 5-8 – (**a**) Alguns aminoácidos não-primários encontrados em proteínas; todos eles são derivados de algum dos aminoácidos primários. Os grupos funcionais extraordinários são mostrados em vermelho. A desmosina é formada por quatro resíduos de lisina, cujos esqueletos carbônicos estão sombreados em cinza. Observe o uso tanto de números como de letras gregas para identificar os átomos de carbono nestas estruturas. (**b**) A ornitina e a citrulina são intermediárias na biossíntese da arginina e no ciclo da uréia.

Aproximadamente 300 aminoácidos adicionais foram encontrados nas células e têm uma grande variedade de funções, mas eles nunca aparecem em proteínas. A **ornitina** e a **citrulina** (Fig. 5-8b) merecem uma nota especial, porque são intermediárias importantes na biossíntese da arginina (Capítulo 22) e no ciclo da uréia (Capítulo 18).

Os aminoácidos podem agir como ácidos e bases

Quando um aminoácido é dissolvido em água, ele existe na solução como um íon dipolar, ou **"zwitterion"** (do alemão, "íon híbrido"), como mostrado na Figura 5-9.

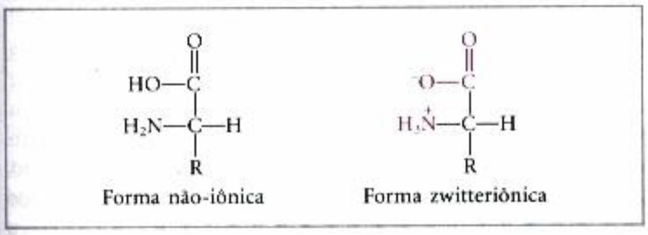
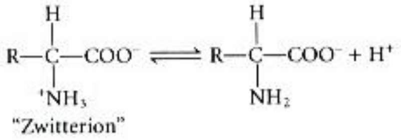


Figura 5-9 – Formas não-iônicas e zwitteriônicas dos aminoácidos. A forma não-iônica não ocorre em quantidades significativas em soluções aquosas. O "zwitterion" predomina em pH neutro.

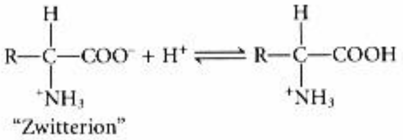
Um "zwitterion" pode agir tanto como um ácido (doador de prótons):



$$R-\overset{H}{\underset{^+NH_3}{C}}-COO^- \rightleftharpoons R-\overset{H}{\underset{NH_2}{C}}-COO^- + H^+$$

"Zwitterion"

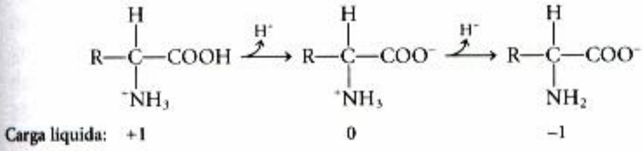
quanto como uma base (receptor de prótons):



$$R-\overset{H}{\underset{^+NH_3}{C}}-COO^- + H^+ \rightleftharpoons R-\overset{H}{\underset{^+NH_3}{C}}-COOH$$

"Zwitterion"

As substâncias que exibem essa dupla natureza são ditas **anfóteras** e freqüentemente chamadas de **anfólitos**, contração de "eletrólitos anfóteros". Um α-aminoácido simples monocarboxílico como a alanina é na realidade um ácido diprótico, quando está totalmente protonado — apresenta dois grupos, o grupo —COOH e o grupo $—NH_3^+$, que podem se ionizar para liberar prótons:



$$R-\overset{H}{\underset{^+NH_3}{C}}-COOH \xrightarrow{H^+} R-\overset{H}{\underset{^+NH_3}{C}}-COO^- \xrightarrow{H^+} R-\overset{H}{\underset{NH_2}{C}}-COO^-$$

Carga líquida: +1 0 −1

Os aminoácidos têm curvas de titulação características

A titulação ácido-base consiste na adição ou na remoção gradual de prótons (Capítulo 4). A Figura 5-10 mostra a curva de titulação da forma diprótica da glicina. A curva apresenta dois estágios distintos, correspodendo à desprotonação dos dois grupos distintos na glicina. Cada um dos dois estágios lembra, na forma, a curva de titulação de um ácido monoprótico, como o ácido acético (veja Fig. 4-15), e pode ser analisado da mesma maneira. Em pH muito baixo, a espécie iônica predominante da glicina é $^+H_3N—CH_2—COOH$, a sua forma totalmente protonada. No ponto médio do primeiro estágio da titulação, no qual o grupo —COOH da glicina perde o seu próton, estão presentes concentrações equimolares da forma doadora de prótons ($^+H_3N—CH_2—COOH$) e da forma receptora de prótons ($^+H_3N—CH_2—COO^-$). No ponto médio de qualquer titulação, um ponto de inflexão é atingido, no qual o pH é igual ao pK_a do grupo protonado que está sendo titulado. Para a glicina, o pH no ponto médio é 2,34, assim o seu grupo —COOH tem um pK_a (indicado como pK_1 na Fig. 5-10) de 2,34 (lembre-se de que no Capítulo 4 foi dito que o pH e o pK_a são simplesmente notações convenientes para a concentração de prótons e a constante de equilíbrio de ionização, respectivamente. O pK_a é uma medida da tendência do grupo para ceder o próton, com essa tendência decrescendo 10 vezes quando o pK_a aumenta de uma unidade). À medida que a titulação prossegue, outro ponto importante é atingido quando o pH assume o valor 5,97. Ali há um outro ponto de inflexão, no qual a remoção do primeiro próton da glicina está essencialmente completa e a remoção do segundo próton apenas começou. Nesse pH, a glicina está presente principalmente como íon dipolar $^+H_3N—CH_2—COO^-$. Voltaremos, em breve, ao significado desse ponto de inflexão na curva de titulação (pI na Fig. 5-10).

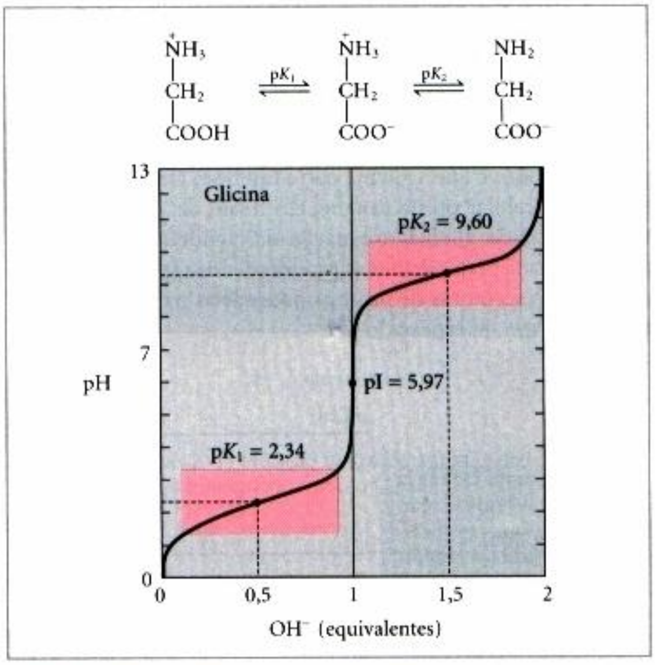


Figura 5-10 – Titulação de um aminoácido. Curva de titulação de uma solução de glicina 0,1M a 25°C. As espécies iônicas predominantes nos pontos críticos da titulação são mostradas acima do gráfico. Os retângulos sombreados em vermelho-claro centrados ao redor de pK_1 = 2,34 e pK_2 = 9,60 indicam as regiões de grande capacidade tamponante.

O segundo estágio da titulação corresponde à remoção de um próton do grupo $—NH_3^+$ da glicina. O pH no ponto médio desse estágio é 9,60, igual ao pK_a (indicado como pK_2 na Fig. 5-10) para o grupo $—NH_3^+$. A titulação está completa em um pH próximo a 12; nesse ponto a forma predominante da glicina é $H_2N—CH_2—COO^-$.

Da curva de titulação da glicina podemos retirar várias informações importantes. Primeiro, ela fornece uma medida quantitativa do pK_a de cada um dos dois grupos ionizáveis: 2,34 para o grupo —COOH e 9,60 para o grupo $—NH_3^+$. Note que o grupo carboxila da glicina é mais de 100 vezes mais ácido (isto é, tem maior facilidade em se ionizar) do que o grupo carboxila do ácido acético, o qual, como vimos no Capítulo 4, tem um pK_a de 4,76, um valor próximo da média para um hidrocarboneto alifático não substituído. Essa perturbação no pK_a da glicina é causada pela repulsão entre o próton que sai e a vizinhança do grupo amino carregado positivamente no átomo de carbono α, como descrito na Figura 5-11. As cargas opostas do "zwitterion" resultante são estabilizadoras, deslocando o equilíbrio mais para a direita. De forma semelhante, o pK_a do grupo amino na glicina é perturbado no sentido de uma redução em relação ao pK_a médio de um grupo amino. Esse efeito é devido em parte aos átomos de oxigênio eletronegativos no grupo carboxila, que tendem a atrair elétrons independentemente da carga do grupo carboxila, aumentando a tendência de um grupo amino liberar um próton. Assim, o grupo α-amino possui um pK_a menor que o de uma amina alifática como a metilamina (Fig. 5-11). Em suma, o pK_a de qualquer grupo funcional é intensamente afetado pelo seu ambiente químico, um fenômeno algumas vezes observado nos sítios ativos de enzimas onde é usado para promover mecanismos de reação extremamente bem adaptados que dependem de valores perturbados de pK_a de grupos doadores/aceptores de prótons em resíduos específicos.

A segunda informação dada pela curva de titulação da glicina (Fig. 5-10) é de que esse aminoácido possui *duas* regiões de poder tamponante (veja Fig. 4-17). Uma dessas regiões é a porção relativamente plana da curva que se estende por aproximadamente uma unidade de pH de cada lado do primeiro valor de pK_a de 2,34, indicando que a glicina é um bom tampão próximo desse pH. A outra região tamponante está centrada em torno do pH 9,60. Observe que a glicina não é um bom tampão no pH do fluido intracelular ou do sangue, em torno de 7,4. Nas regiões tamponantes da glicina, a equação de Henderson-Hasselbach pode ser usada para calcular as proporções de espécies de glicina doadoras e receptoras de prótons necessárias para preparar um tampão de um determinado pH.

As curvas de titulação predizem a carga elétrica dos aminoácidos

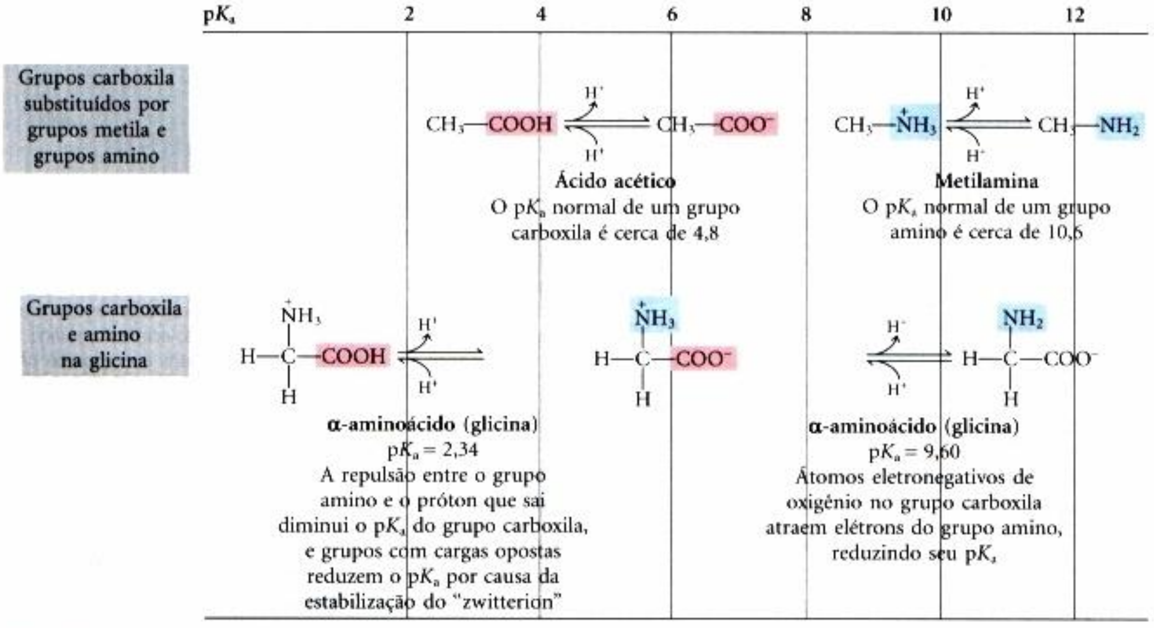
Outra informação importante derivada da curva de titulação de um aminoácido é a relação existente entre a sua carga elétrica líquida e o pH da solução. Em pH 5,97, o ponto de inflexão entre os dois estágios de sua curva de titulação, a glicina está presente predominantemente em sua forma dipolar, totalmente ionizada mas sem carga elétrica líquida (Fig. 5-10). O pH característico no qual a carga total é igual a zero é denominado **ponto isoelétrico** ou **pH isoelétrico**, designado por **pI**. Para a glicina, que não possui grupos ionizáveis em sua cadeia lateral, o ponto isoelétrico é simplesmente a média aritmética dos dois valores de pK_a:

$$\mathrm{pI} = \frac{1}{2}\,(\mathrm{p}K_1 + \mathrm{p}K_2) = \frac{1}{2}\,(2{,}34 + 9{,}60) = 5{,}97$$

Como é evidente na Figura 5-10, a glicina tem uma carga elétrica líquida negativa em qualquer pH acima do seu pI e, portanto, mover-se-á em direção ao elétrodo positivo (o ânodo) quando colocada em um campo elétrico. Em qualquer pH abaixo do seu pI, a glicina terá uma carga elétrica líquida positiva e mover-se-á em direção ao elétrodo negativo (o cátodo). Quanto mais afastado o valor de pH de uma solução de glicina do seu ponto isoelétrico, maior será a carga elétrica líquida da população de moléculas de glicina. Em pH 1, por exemplo, a glicina existe inteiramente na forma $^+H_3N—CH_2—COOH$, com carga líquida positiva de 1. Em pH 2,34, no qual ocorre uma mistura igual das duas formas $^+H_3N—CH_2—COOH$ e $^+H_3N—CH_2—COO^-$, a carga média ou líquida positiva é 0,5. O sinal e a magnitude da carga líquida de qualquer aminoácido e em qualquer valor de pH podem ser preditos da mesma forma.

Os aminoácidos diferem em suas propriedades acidobásicas

Muitos aminoácidos diferentes compartilham propriedades comuns, o que permite algumas generalizações simplificadoras a respeito do comportamento acidobásico de suas diferentes classes.



pKa
2
4
6
8
10
12
Grupos carboxila substituídos por grupos metila e grupos amino
CH3—COOH
H+
CH3—COO−
Ácido acético
O pKa normal de um grupo carboxila é cerca de 4,8
CH3—NH3+
CH3—NH2
Metilamina
O pKa normal de um grupo amino é cerca de 10,6
Grupos carboxila e amino na glicina
α-aminoácido (glicina)
pKa = 2,34
A repulsão entre o grupo amino e o próton que sai diminui o pKa do grupo carboxila, e grupos com cargas opostas reduzem o pKa por causa da estabilização do "zwitterion"
α-aminoácido (glicina)
pKa = 9,60
Átomos eletronegativos de oxigênio no grupo carboxila atraem elétrons do grupo amino, reduzindo seu pKa

Figura 5-11 – Efeito do ambiente químico sobre o pK_a. Os valores de pK_a para os grupos ionizáveis da glicina são menores que aqueles para os grupos amino e carboxila simples, substituídos por grupos metila. Essas perturbações no sentido de uma redução do pK_a são devidas a interações intramoleculares. Efeitos semelhantes podem ser causados por grupos químicos posicionados nas vizinhanças — por exemplo, no sítio ativo de uma enzima.

Todos os aminoácidos com um único grupo α-amino, um único grupo α-carboxila e um grupo R desprovido de grupos ionizáveis têm curvas de titulação que se assemelham à da glicina (Fig. 5-10). Esse grupo de aminoácidos é caracterizado por apresentar valores de pK_a muito similares, embora não idênticos: pK_a do grupo —COOH na região de 1,8 a 2,4 e pK_a do grupo $—NH_3^+$ na região de 8,8 a 11,0 (Tabela 5-1, pág. 90).

Os aminoácidos com grupo R ionizável têm curvas de titulação mais complexas, exibindo *três* estágios correspondentes aos três passos de ionizações possíveis; portanto, eles possuem três valores de pK_a. O terceiro estágio, correspondente à titulação do grupo R, combina-se em alguma extensão com os outros dois. As curvas de titulação de dois representantes desse grupo, glutamato e histidina, são mostradas na Figura 5-12. Os pontos isoelétricos dos aminoácidos nessa classe refletem o tipo de grupo R ionizável presente. Por exemplo, o glutamato tem um pI de 3,22, consideravelmente mais baixo que o da glicina. Isso é o resultado da presença de dois grupos carboxila os quais, na média dos seus valores de pK_a (3,22), contribuem com uma carga líquida negativa de −1 e esta contrabalança a carga +1 contribuída pelo grupo amino. Da mesma forma, o pI da histidina é 7,59, pois ela possui dois grupos que estão carregados positivamente quando está protonada (a média dos valores de pK_a dos grupos amino e imidazol), muito maior, então, do que o da glicina.

Outra importante generalização pode ser feita a respeito do comportamento acidobásico dos 20 aminoácidos primários. Sob condições gerais de exposição livre e aberta ao meio ambiente aquoso, apenas a histidina tem um grupo R (pK_a = 6,0) capaz de exercer função tamponante significativa próxima do pH neutro, usualmente encontrado nos fluidos intra e intercelulares da maioria dos animais e bactérias. Nenhum outro aminoácido tem a sua cadeia lateral com um valor de pK_a próximo o bastante de pH 7 para que possa ser um tampão fisiológico efetivo (Tabela 5-1).

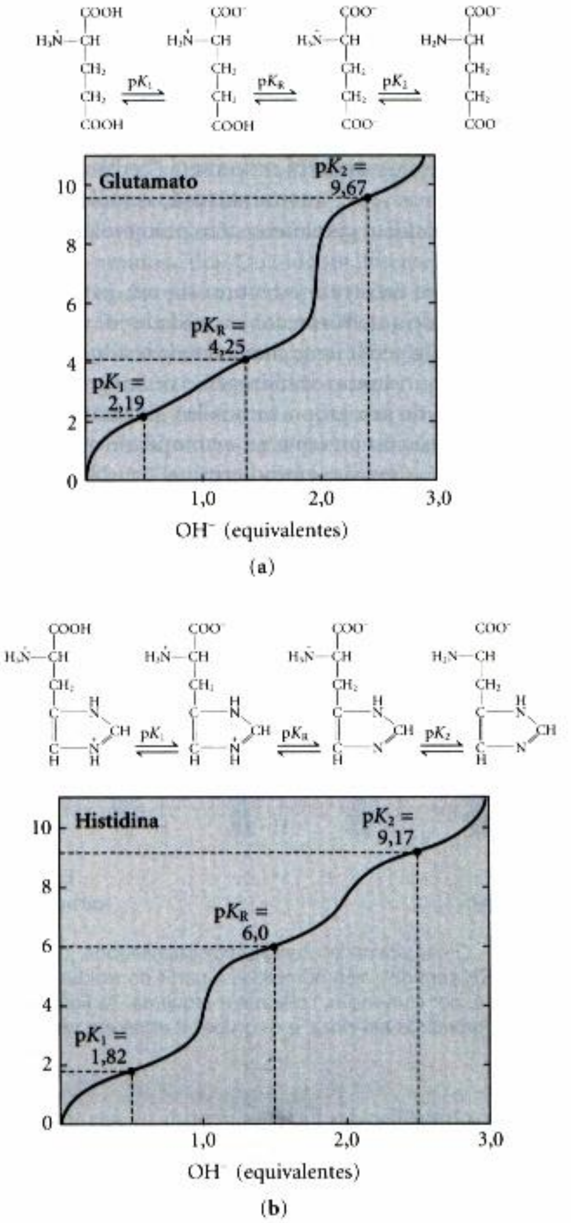


Figura 5-12 – Curvas de titulação do glutamato (**a**) e da histidina (**b**). O pK_a do grupo R está designado como pK_R.

Peptídeos e Proteínas

Agora analisaremos os polímeros de aminoácidos, ou seja, os **peptídeos** e as **proteínas**. Os peptídeos que ocorrem biologicamente variam muito de tamanho, desde moléculas pequenas contendo apenas dois ou três aminoácidos até macromoléculas contendo milhares de aminoácidos. Focalizaremos a seguir as propriedades químicas fundamentais desses polímeros.

Os peptídeos são cadeias de aminoácidos

Duas moléculas de aminoácidos podem ser unidas covalentemente por meio de uma ligação amida substituída, chamada de **ligação peptídica**, para formar um dipeptídeo. Tal ligação é formada por remoção dos elementos da água (desidratação) de um grupo α-carboxila de um aminoácido e de um grupo α-amino de outro (Fig. 5-13). A formação da ligação peptídica é um exemplo de reação de condensação, uma classe de reação muito comum nas células vivas. Note que, como mostrado na Figura 5-13, essa reação tem um ponto de equilíbrio que favorece os reagentes, e não os produtos. Para tornar a reação termodinamicamente mais favorável, o grupo carboxila precisa ser quimicamente modificado ou ativado, de forma que o grupo hidroxila possa ser eliminado mais prontamente. Uma abordagem química desse problema está delineada no fim deste capítulo. A maneira biológica de resolver o problema da formação da ligação peptídica é o principal tópico do Capítulo 27.

Três aminoácidos podem ser reunidos por duas ligações peptídicas para formar um tripeptídeo, da mesma maneira os ami-

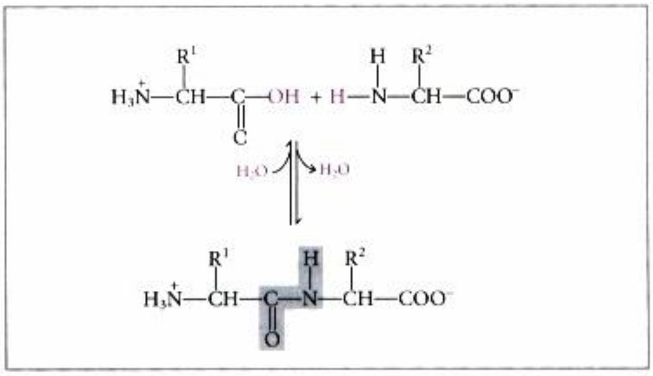


Figura 5-13 – Formação de uma ligação peptídica por condensação. O grupo α-amino de um aminoácido (com um grupo R^2) atua como um nucleófilo (veja Tabela 3-4), deslocando o grupo hidroxila de outro aminoácido (com um grupo R^1), formando uma ligação peptídica (sombreada em cinza). Grupos amino são bons nucleófilos, mas o grupo hidroxila é um mau grupo de saída e não é facilmente deslocado. Em pH fisiológico, a reação não ocorre com a formação de quantidades apreciáveis dos produtos.

noácidos podem ser reunidos para formar tetra e pentapeptídeos. Quando um pequeno número de aminoácidos é reunido dessa forma, a estrutura é chamada de **oligopeptídeo** e, quando muitos aminoácidos são reunidos, o produto é chamado de **polipeptídeo**. As proteínas podem ter milhares de unidades de aminoácidos. Embora os termos "proteína" e "polipeptídeos" possam ser, algumas vezes, intercambiáveis, as moléculas referidas como polipeptídeos geralmente têm peso molecular abaixo de 10.000.

A Figura 5-14 mostra a estrutura de um pentapeptídeo. Como mencionado anteriormente, as unidades de aminoácidos de um peptídeo são geralmente chamadas de **resíduos** (pois cada um deles perdeu um átomo de hidrogênio de seu grupo amino e a parte hidroxila do seu grupo carboxila). Em um peptídeo, o resíduo de aminoácido presente na extremidade que exibe um grupo α-amino é o resíduo **aminoterminal** (ou *N*-terminal); o resíduo na outra extremidade, a que exibe um grupo carboxila livre, é o resíduo **carboxiterminal** (ou *C*-terminal).

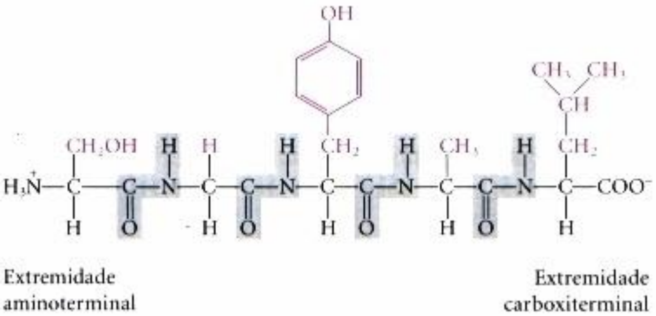


Figura 5-14 – O pentapeptídeo serilgliciltirosilalanileucina, ou Ser–Gly–Tyr–Ala–Leu. Os peptídeos são nomeados a partir do resíduo aminoterminal, o qual é, por convenção, colocado à esquerda. As ligações peptídicas estão sombreadas em cinza, e os grupos R estão em vermelho.

Embora a hidrólise das ligações peptídicas seja uma reação exergônica, ela ocorre lentamente por causa de sua alta energia de ativação. Como resultado, as ligações peptídicas nos peptídeos e nas proteínas são muito estáveis, com meia-vida ($t_{1/2}$) de cerca de 7 anos na maioria das condições intracelulares.

Os peptídeos podem ser distinguidos entre si por meio de seu comportamento de ionização

Os peptídeos contêm apenas um grupo α-amino livre e um grupo α-carboxila livre, um em cada extremidade da cadeia (Fig. 5-15). Esses grupos se ionizam da mesma forma que o fazem nos aminoácidos livres, embora as constantes de ionização sejam de valores numéricos diferentes, o que é devido à ausência, no carbono α, do grupo de carga oposta. Os grupos α-amino e α-carboxila de todos os outros aminoácidos não-terminais estão ligados covalentemente entre si, fazendo parte das ligações peptídicas, a qual não se ioniza e, assim, não contribui para o comportamento acidobásico global dos peptídeos. Entretanto, os grupos R de alguns aminoácidos podem se ionizar (Tabela 5-1, pág. 90) e isso contribuirá para as propriedades acidobásicas globais (Fig. 5-15) dos peptídeos que os contenham. Assim, o comportamento acidobásico de um peptídeo pode ser predito a partir dos seus grupos α-amino e α-carboxila livres e da natureza de seus inúmeros grupos R ionizáveis. Como os aminoácidos livres, os peptídeos têm curvas de titulação características e pH isoelétrico (pI) característico, no qual eles não se moverão quando colocados em um campo elétrico. Essas propriedades são exploradas em algumas técnicas empregadas para separar peptídeos e proteínas entre si, como veremos adiante neste capítulo. Deve ser enfatizado que o valor do pK_a de um grupo R ionizável pode se alterar ligeiramente quando um aminoácido se torna um resíduo em um peptídeo. A perda de carga nos gupos α-carboxila e α-amino, as interações com outros grupos R e outros fatores ambientais podem afetar o pK_a. Os valores de pK_a para os grupos R listados na Tabela 5-1 podem ser um guia útil para se saber em que faixa de pH um dado grupo irá se ionizar, mas não podem ser estritamente aplicados aos peptídeos.

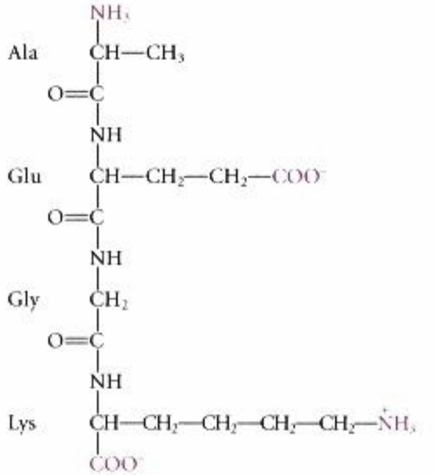
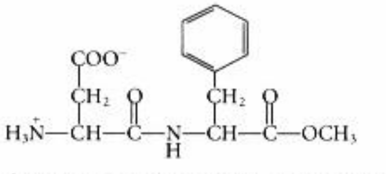


Figura 5-15 – Alanilglutamilglicilisina. Este tetrapeptídeo possui um grupo α-amino livre, um grupo α-carboxila livre e dois grupos R ionizáveis. Os grupos ionizados em pH 7 aparecem em vermelho.

Peptídeos e polipeptídeos biologicamente ativos ocorrem em uma ampla faixa de tamanhos

Nenhuma generalização pode ser feita com relação aos pesos moleculares de peptídeos e proteínas biologicamente ativos em relação a suas funções. Peptídeos de ocorrência natural variam em tamanho, entre dois a muitos milhares de resíduos de aminoácidos. Mesmo os menores peptídeos podem ter efeitos biológicos importantes. É o caso do dipeptídeo comercial sintético, éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina, o adoçante artificial mais conhecido por aspartame ou NutraSweet.



Éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina
(aspartame)

Muitos peptídeos de pequeno tamanho exercem seus efeitos em concentrações muito pequenas. Por exemplo, diversos hormônios de vertebrados (Capítulo 23) são peptídeos de pequeno tamanho. Aí estão incluídos a oxitocina (nove resíduos de aminoácidos), que é secretada pela hipófise posterior e estimula as concentrações uterinas; a bradicinina (nove resíduos), que inibe a inflamação dos tecidos e o fator liberador de tirotropina, que é formada no hipotálamo e estimula a liberação de outro hormônio, a tirotropina, pela hipófise anterior. Alguns venenos extremamente tóxicos de cogumelos, como a amanitina, também são peptídeos de pequeno tamanho, bem como muitos antibióticos.

Um pouco maiores são os pequenos polipeptídeos e oligopeptídeos, como a insulina, um hormônio pancreático, que contém duas cadeias polipeptídicas, uma delas com 30 resíduos de aminoácidos e a outra com 21. O glucagon, outro hormônio pancreático, possui 29 resíduos e sua ação é antagônica à da insulina. A corticotropina é um hormônio de 39 resíduos secretado pela hipófise anterior que estimula o córtex adrenal.

Qual é o comprimento das cadeias polipeptídicas nas proteínas? Conforme mostra a Tabela 5-2, os comprimentos variam consideravelmente. O citocromo *c* humano possui 104 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia; o quimotripsinogênio bovino possui 245 resíduos. No extremo oposto está a titina, um constituinte do músculo de vertebrados, que possui perto de 27.000 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de cerca de 3.000.000. A grande maioria dos polipeptídeos de ocorrência natural é muito menor do que isso, contendo menos de 2.000 resíduos de aminoácidos.

Tabela 5-2 – Características moleculares de algumas proteínas

	Peso molecular	Número de resíduos	Número de cadeias polipeptídicas
Citocromo c (humano)	13.000	104	1
Ribonuclease A (pâncreas bovino)	13.700	124	1
Lisozima (clara do ovo)	13.930	129	1
Mioglobina (coração eqüino)	16.890	153	1
Quimotripsina (pâncreas bovino)	21.600	241	3
Quimotripsinogênio (bovino)	22.000	245	1
Hemoglobina (humana)	64.500	574	4
Soroalbumina (humana)	68.500	609	1
Hexoquinase (levedura)	102.000	972	2
RNA polimerase (*E. coli*)	450.000	4.158	5
Apolipoproteína B (humana)	513.000	4.536	1
Glutamina sintetase (*E. coli*)	619.000	5.628	12
Titina (humana)	2.993.000	26.926	1

Algumas proteínas consistem de uma única cadeia polipeptídica, mas outras, denominadas proteínas **multissubunitárias**, possuem dois ou mais polipeptídeos associados de forma não-covalente (Tabela 5-2). As cadeias polipeptídicas individuais em uma proteína multissubunitária podem ser idênticas ou diferentes. Se pelo menos duas forem idênticas, a proteína é denominada **oligomérica**, e as unidades idênticas (consistindo de uma ou mais cadeias polipeptídicas) são os **protômeros**. A hemoglobina, por exemplo, possui quatro subunidades polipeptídicas: duas cadeias α idênticas e duas cadeias β idênticas, sendo as quatro cadeias unidas por interações não-covalentes. Cada subunidade α é pareada de maneira idêntica com uma subunidade β no interior da estrutura dessa proteína multissubunitária, de modo que a hemoglobina pode ser considerada como um tetrâmero de quatro subunidades polipeptídicas ou um dímero de protômeros $\alpha\beta$.

Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas unidas covalentemente. Por exemplo, as duas cadeias polipeptídicas da insulina são ligadas por ligações dissulfeto. Em tais casos, os polipeptídeos individuais não são considerados como subunidades, mas comumente são denominados simplesmente como cadeias.

Podemos calcular o número aproximado de resíduos de aminoácidos em uma proteína simples sem outros grupos químicos, dividindo seu peso molecular por 110. Embora o peso molecular médio dos 20 aminoácidos primários seja de cerca de 138, os aminoácidos menores predominam na maioria das proteínas; se levarmos em conta as proporções em que os diversos aminoácidos aparecem nas proteínas (Tabela 5-1, pág. 90), o peso molecular médio estará próximo de 128. Como uma molécula de água (M_r 18) é removida para criar cada ligação polipeptídica, o peso molecular médio de um resíduo de aminoácido em uma proteína é, aproximadamente, 128 – 18 = 110.

Os polipeptídeos possuem composições de aminoácidos características

A hidrólise de peptídeos ou proteínas com ácidos fornece uma mistura de α-aminoácidos. Quando totalmente hidrolisada, cada tipo de proteína fornece uma proporção ou mistura característica dos diferentes aminoácidos. Os 20 aminoácidos primários quase nunca se apresentam em quantidades iguais em uma proteína. Alguns aminoácidos podem aparecer apenas uma única vez por molécula ou mesmo não existirem em uma determinada proteína; outros podem estar presentes em grandes quantidades. A Tabela 5-3 mostra a composição das misturas de aminoácidos obtidas pela hidrólise completa do citocromo *c* bovino e do quimotripsinogênio, o precursor inativo da enzima digestiva quimotripsina. Essas duas proteínas, com funções muito diferentes, também diferem significativamente nos números relativos de cada tipo de aminoácido que contêm.

Tabela 5-3 – Composição de aminoácidos de duas proteínas*

Aminoácido	Número de resíduos por molécula de proteína	
	Citocromo bovino c	Quimotripsinogênio bovino
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245

* Note que os procedimentos-padrão para a hidrólise ácida de proteínas convertem Asn e Gln em Asp e Glu, respectivamente. Além disso, Trp é destruído. Procedimentos especiais devem ser empregados para se determinar as quantidades desses aminoácidos.

Algumas proteínas contêm outros grupos químicos além dos aminoácidos

Muitas proteínas, por exemplo, as enzimas ribonuclease e quimotripsinogênio, contêm apenas resíduos de aminoácidos e nenhum outro grupo químico; estas são consideradas proteínas simples. No entanto, algumas proteínas contêm componentes químicos permanentemente associados além dos aminoácidos; essas proteínas são denominadas **proteínas conjugadas**. A porção não-aminoácida de uma proteína conjugada é denominada **grupo prostético**. Proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza química de seus grupos prostéticos (Tabela 5-4); por exemplo, as **lipoproteínas** contêm lipídios, as **glicoproteínas** contêm açúcares e as **metaloproteínas** contêm um metal es-

Tabela 5-4 – Proteínas conjugadas

Classe	Grupo(s) prostético(s)	Exemplo
Lipoproteínas	Lipídios	β_1-lipoproteína do sangue
Glicoproteínas	Carboidratos	Imunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína do leite
Hemoproteínas	Heme (ferro porfirina)	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleotídeos de flavina	Succinato desidrogenase
Metaloproteínas	Ferro	Ferritina
	Zinco	Álcool desidrogenase
	Cálcio	Calmodulina
	Molibdênio	Dinitrogenase
	Cobre	Plastocianina

pecífico. Algumas proteínas contêm mais de um grupo prostético. Geralmente, o grupo prostético tem um importante papel na função biológica das proteínas.

Existem diversos níveis de estrutura protéica

Para grandes macromoléculas, como as proteínas, a tarefa de descrever e entender a sua estrutura deve ser abordada em diferentes níveis de complexidade e hierarquia conceitual. Quatro níveis estruturais são comumente definidos (Fig. 5-16). Uma descrição de todas as ligações covalentes (principalmente as ligações peptídicas e dissulfeto) unindo os resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é a sua **estrutura primária.** O elemento mais importante da estrutura primária é a *seqüência* de resíduos de aminoácidos. A **estrutura secundária** refere-se aos arranjos particularmente estáveis dos resíduos de aminoácidos, dando origem a padrões estruturais recorrentes. A **estrutura terciária** descreve todos os aspectos do dobramento tridimensional de um polipeptídeo. Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo espacial é denominado **estrutura quaternária.**

Trabalhando com as Proteínas

Nosso entendimento da estrutura e da função das proteínas foi obtido a partir do estudo de diversas proteínas individuais. Para estudarmos uma proteína em detalhes, ela deve ser separada de todas as demais proteínas e devem estar disponíveis as técnicas que permitam determinar suas propriedades. Os métodos necessários provêm da química de proteínas, uma disciplina tão antiga quanto a própria bioquímica e que mantém uma posição central na pesquisa bioquímica.

As proteínas podem ser separadas e purificadas

Uma preparação pura de uma proteína é essencial antes de suas propriedades, composição e seqüência de aminoácidos poderem ser determinadas. Considerando que as células possuem milhares de proteínas distintas, como uma delas pode ser purificada? Os métodos de separação de proteínas utilizam as propriedades que variam de uma proteína a outra. Por exemplo, muitas proteínas se ligam a outras biomoléculas com grande especificidade, e tais proteínas podem ser separadas com base em suas propriedades de ligação.

A fonte de uma proteína é geralmente tecido ou células microbianas. O primeiro passo em qualquer procedimento de purificação de proteínas é o rompimento dessas células, liberando suas proteínas em uma solução denominada **extrato bruto** ou **total.** Se necessário, a centrifugação diferencial pode ser usada para preparar frações subcelulares ou para isolar organelas específicas (veja Fig. 2-20).

Uma vez pronto o extrato ou a preparação de uma organela, diversos métodos estão disponíveis para purificar uma ou mais proteínas ali contidas. Geralmente, o extrato é submetido a tratamentos que separam as proteínas em frações diferentes, baseados em alguma propriedade como carga ou tamanho, processo denominado **fracionamento.** As etapas iniciais do fracionamento empregam diferenças na solubilidade das proteínas, que dependem de diversos fatores como o pH, a temperatura e a concentração salina, entre outros. A solubilidade de uma proteína geralmente é reduzida em presença de altas concentrações salinas, um efeito denominado "salting out". A adição de um sal em quantidades adequadas pode precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto outras permanecerão em solução. O sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) é freqüentemente utilizado para esse propósito em virtude de sua alta solubilidade em água.

Uma solução que contém a proteína de interesse freqüentemente deve ser alterada antes que sejam possíveis as etapas de purificação subseqüentes. Por exemplo, a **diálise** é um procedimento que separa proteínas de solventes, utilizando o maior tamanho das proteínas como fator determinante. O extrato parcialmente purificado é colocado em uma bolsa ou tubo feito de uma

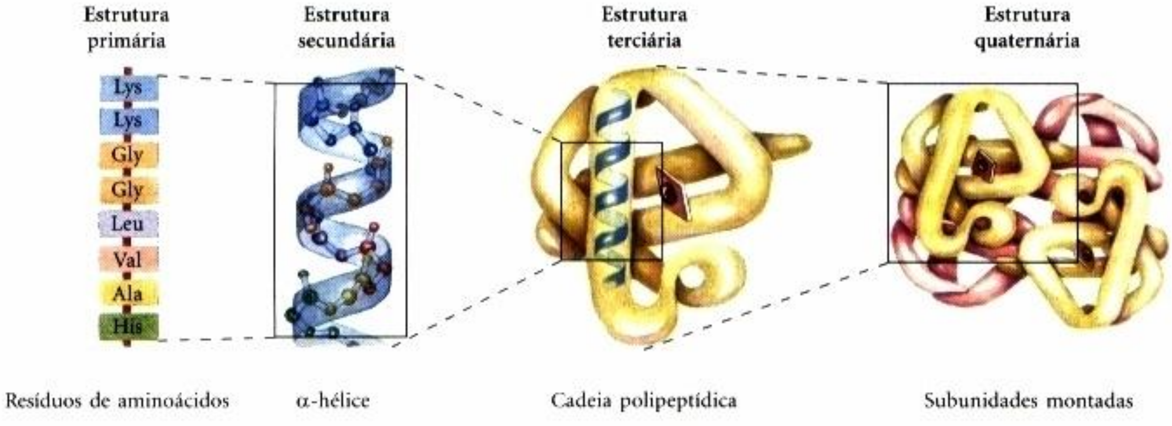


Figura 5-16 – Níveis de estrutura nas proteínas. A *estrutura primária* consiste em uma seqüência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e inclui todas as ligações dissulfeto. O polipeptídeo resultante pode ser enovelado em unidades de *estrutura secundária*, como ocorre em uma α-hélice. A hélice é uma parte da *estrutura terciária* do polipeptídeo enovelado que pode ser uma das subunidades formadoras da *estrutura quaternária* de uma proteína multissubunitária, neste caso, a hemoglobina.

membrana semipermeável. Quando essa membrana que contém a proteína é suspensa em um volume maior de solução tamponada de força iônica apropriada, a membrana permite a livre passagem de sais e do tampão, mas não das proteínas. Dessa forma, a diálise retém grandes proteínas em uma bolsa ou tubo membranoso, permitindo que as concentrações de outros solutos presentes na preparação protéica se alterem até atingirem o equilíbrio com a solução externa à membrana. A diálise pode ser usada, por exemplo, para a remoção do sulfato de amônio presente na preparação protéica.

Os métodos mais poderosos para o fracionamento protéico fazem uso da **cromatografia em coluna**, que, por sua vez, faz uso de diferenças em cargas, tamanho, afinidade de ligação e outras propriedades das moléculas protéicas (Fig. 5-17). Um material sólido e poroso com propriedades químicas apropriadas (fase estacionária) é mantido em uma coluna, sendo percolado por uma solução tamponada (fase móvel). A solução que contém proteínas é adicionada no topo da coluna, de modo a percolar a matriz sólida em uma banda em contínua expansão pela fase móvel (Fig. 5-17b). As proteínas individuais migram mais rapidamente ou mais lentamente pela coluna, dependendo de suas propriedades. Por exemplo, na cromatografia de troca catiônica (Fig. 5-18a), a matriz sólida possui grupos carregados negativamente. Na fase móvel, proteínas com carga líquida positiva migram mais lentamente pela matriz do que as com carga líquida negativa, já que a migração das primeiras é retardada pela interação com a fase estacionária. Os dois tipos de proteínas podem separar-se em duas bandas distintas. A expansão da banda protéica na fase móvel (solução protéica) é devida tanto à separação de proteínas com propriedades distintas como ao espalhamento devido à difusão. À medida que se aumenta o comprimento da coluna, a resolução de dois tipos de proteínas com diferentes cargas líquidas geralmente melhora. Entretanto, a velocidade de fluxo da solução protéica pela coluna geralmente diminui com o aumento do comprimento da coluna. Com o aumento do tempo gasto na passagem pela coluna, a resolução pode diminuir por causa do maior espalhamento das bandas protéicas por difusão.

A Figura 5-18 mostra duas outras variações da cromatografia em coluna, além da cromatografia de troca iônica.

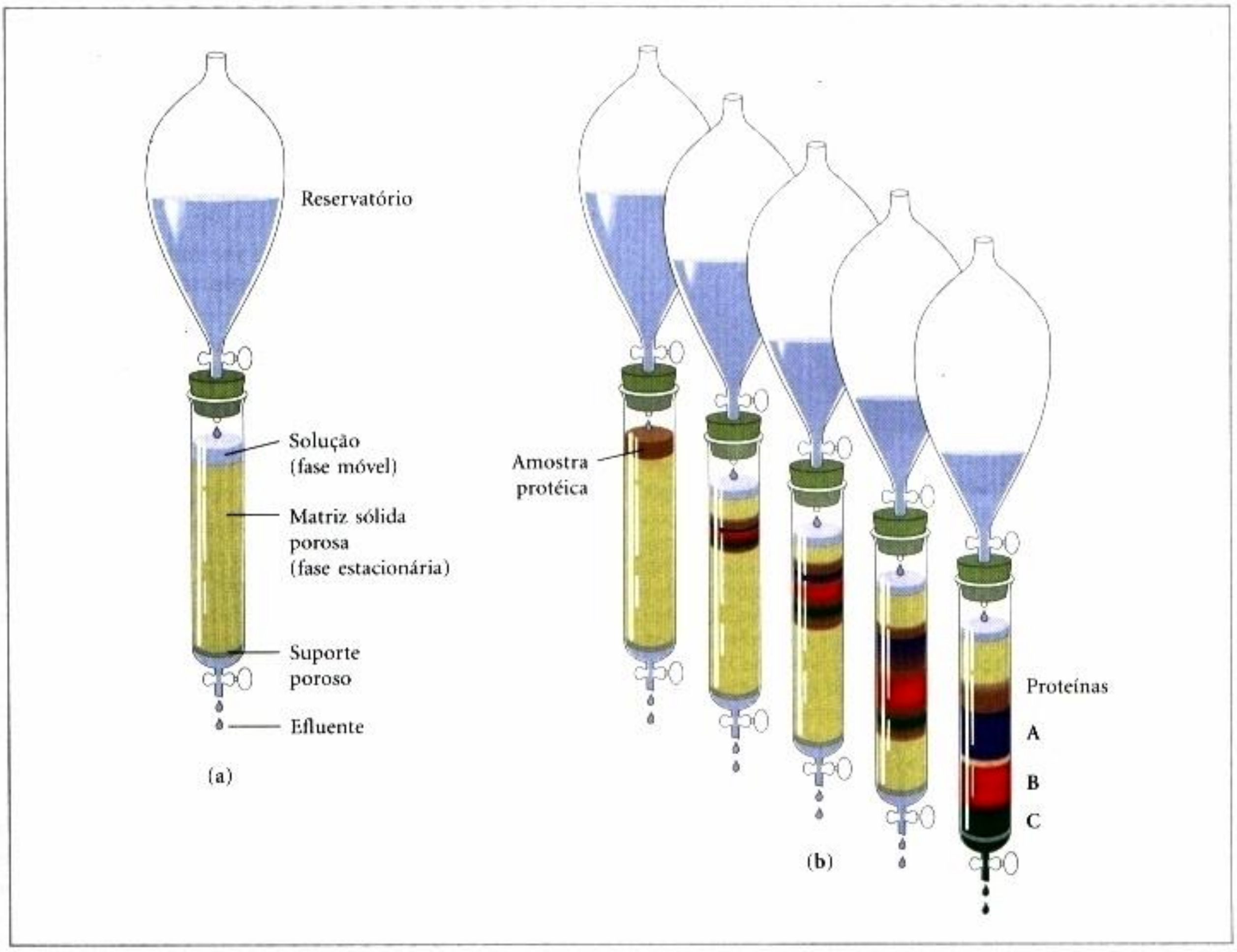
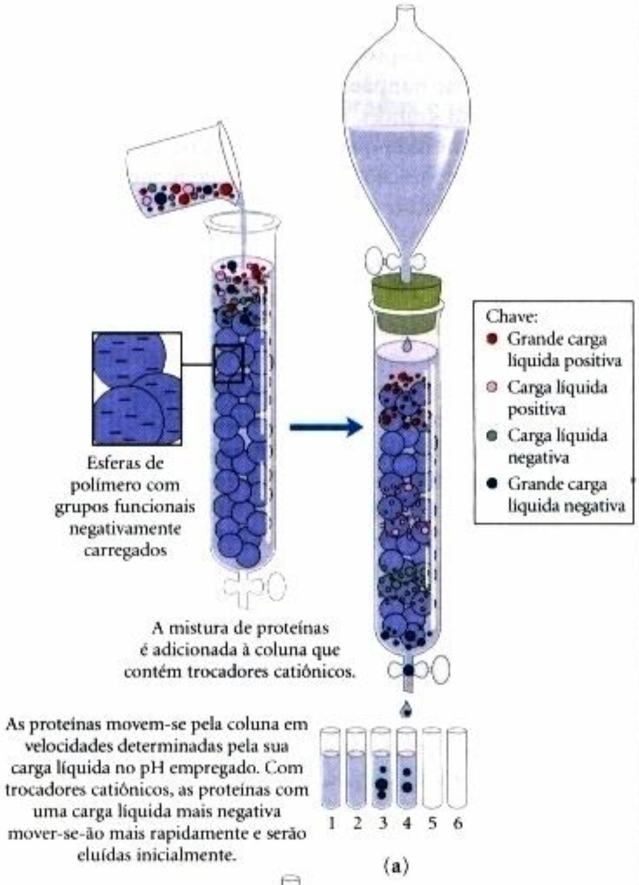


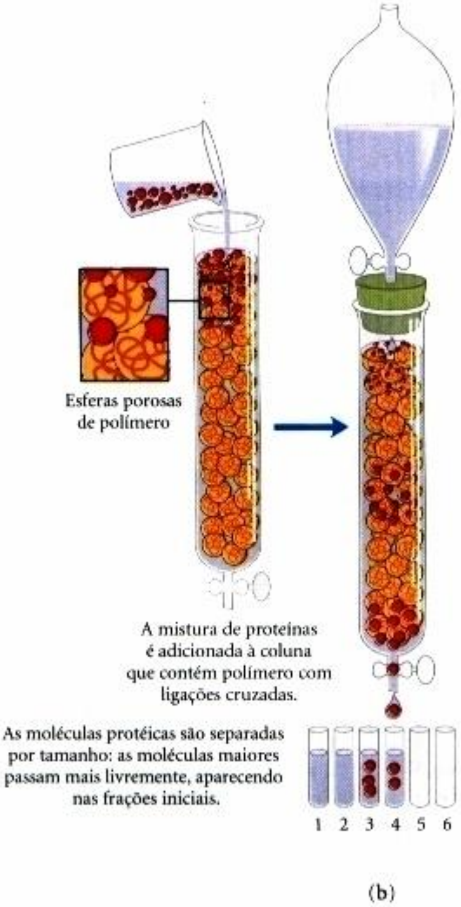
Figura 5-17 – A cromatografia em coluna. (**a**) Os elementos-padrão de uma coluna cromatográfica. Um material sólido e poroso é colocado no interior de uma coluna geralmente feita de alguma forma de plástico. O material sólido (a matriz) constitui a fase estacionária, através do qual flui uma solução, a fase móvel. A solução que sai pela extremidade inferior da coluna (o efluente) é constantemente reposta pela solução suprida por um reservatório no topo da coluna. (**b**) A solução protéica a ser separada é aplicada no topo da coluna e deixada percolar a matriz sólida. Mais solução é adicionada acima dela. A solução protéica forma uma banda na fase móvel que é inicialmente da profundidade da solução protéica aplicada à coluna. À medida que as proteínas migram pela coluna, são retardadas em graus diferentes pelas suas diferentes interações com o material da matriz. A banda protéica vai se alargando, à medida que se move pela coluna. Os diferentes tipos de proteínas (como A, B e C, mostradas em azul, vermelho e verde) gradualmente se separam uns dos outros, formando bandas internas à banda mais ampla das proteínas. A separação melhora (aumenta a resolução) com o aumento do comprimento da coluna. Entretanto, cada banda protéica individual também se alarga com o tempo, em virtude do espalhamento por difusão, um processo que diminui a resolução. Neste exemplo, a proteína A é bem separada de B e C, mas o espalhamento por difusão impede a separação completa de B e C sob essas condições.

Figura 5-18 – Três métodos cromatográficos usados na purificação de proteínas. (**a**) A **cromatografia de troca iônica** explora as diferenças no sinal e na magnitude das cargas elétricas líquidas das proteínas em um determinado pH. A matriz da coluna é um polímero sintético que contém grupos carregados ligados a ela; as que possuem grupos aniônicos ligados são denominadas **trocadoras catiônicas**, e as com grupos catiônicos ligados são denominadas **trocadoras aniônicas**. A cromatografia de troca iônica em um trocador catiônico é aqui mostrada. A afinidade de cada proteína pelos grupos carregados na coluna é afetada pelo pH (que determina o estado de ionização da molécula) e pela concentração dos íons salinos livres da solução envolvente que com ela competem. A separação pode ser otimizada alterando-se o pH e/ou a concentração salina da fase móvel, de modo a criar um gradiente de pH e/ou um gradiente salino. (**b**) **Cromatografia de exclusão por tamanho**, também denominada filtração em gel, separa as proteínas de acordo com seus tamanhos. A matriz da coluna é um polímero que contém ligações cruzadas com poros de um determinado tamanho. As proteínas maiores migram mais rapidamente do que as menores por serem grandes demais para penetrar nos poros das esferas, o que faz com que tenham um percurso mais direto através da coluna. As proteínas menores penetram nos poros e são retardadas pelo caminho mais tortuoso que executam através da coluna. (**c**) A **cromatografia de afinidade** separa as proteínas por suas especificidades de ligação. As proteínas retidas na coluna são aquelas que se ligam especificamente a um ligante que, por sua vez, está ligado às esferas (em bioquímica, o termo "ligante" é empregado para se referir a um grupo ou molécula que se liga a uma macromolécula, como por exemplo as proteínas). Após a eliminação por lavagem das proteínas que não se ligaram à matriz, a proteína ligada de interesse é eluída (eliminada da coluna) por uma solução que contém o ligante livre.


Esferas de polímero com grupos funcionais negativamente carregados
Chave:
● Grande carga líquida positiva
○ Carga líquida positiva
● Carga líquida negativa
● Grande carga líquida negativa
1 2 3 4 5 6
(a)

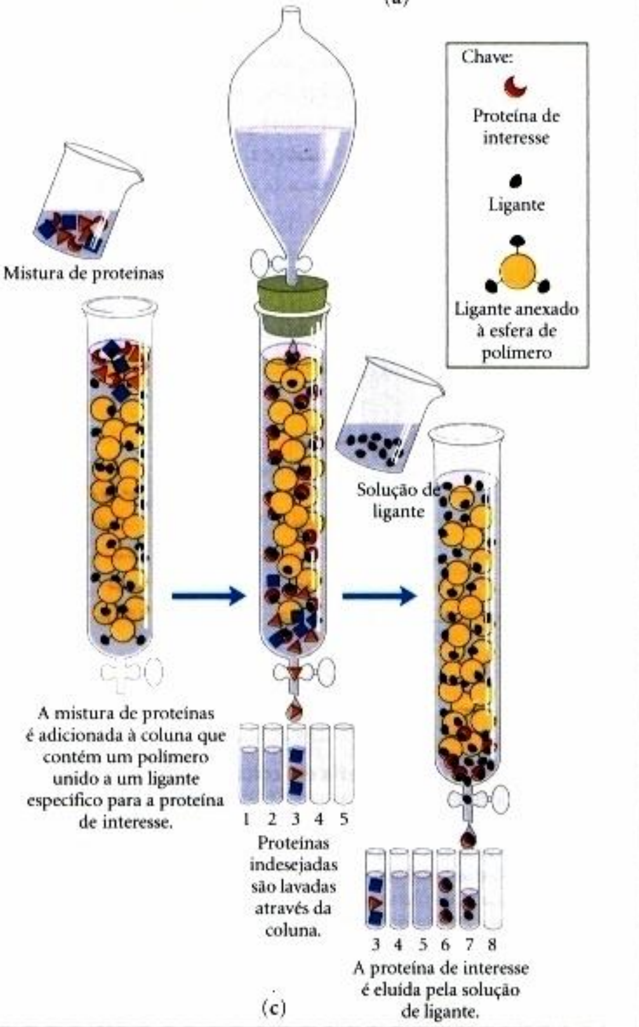
A mistura de proteínas é adicionada à coluna que contém trocadores catiônicos.

As proteínas movem-se pela coluna em velocidades determinadas pela sua carga líquida no pH empregado. Com trocadores catiônicos, as proteínas com uma carga líquida mais negativa mover-se-ão mais rapidamente e serão eluídas inicialmente.


Esferas porosas de polímero
1 2 3 4 5 6
(b)

A mistura de proteínas é adicionada à coluna que contém polímero com ligações cruzadas.

As moléculas protéicas são separadas por tamanho: as moléculas maiores passam mais livremente, aparecendo nas frações iniciais.


Chave:
Proteína de interesse
Ligante
Ligante anexado à esfera de polímero
Mistura de proteínas
Solução de ligante
1 2 3 4 5
3 4 5 6 7 8
(c)

A mistura de proteínas é adicionada à coluna que contém um polímero unido a um ligante específico para a proteína de interesse.

Proteínas indesejadas são lavadas através da coluna.

A proteína de interesse é eluída pela solução de ligante.

Um refinamento mais moderno dos métodos cromatográficos é o **HPLC**, ou **cromatografia líquida de alta eficiência.** O HPLC faz uso de bombas de alta pressão que aceleram o movimento das moléculas protéicas pela coluna, bem como de materiais cromatográficos de alta qualidade que podem suportar a força esmagadora do fluxo pressurizado. Em razão da redução do tempo de trânsito pela coluna, o HPLC pode limitar o espalhamento por difusão das bandas protéicas, aumentando intensamente a resolução.

A abordagem utilizada para a purificação de uma proteína que não tenha sido anteriormente isolada é baseada tanto em precedentes estabelecidos como pelo sentido comum. Na maioria dos casos, diversos métodos diferentes devem ser usados seqüencialmente para purificar uma proteína completamente. A escolha do método é algo empírica e muitos protocolos podem ser experimentados antes que o mais eficiente deles possa ser encontrado. A tentativa e o erro podem ser freqüentemente minimizados, tomando-se por base técnicas de purificação desenvolvidas para proteínas similares. Protocolos de purificação para milhares de proteínas já foram publicados. O bom senso nos diz que procedimentos de menor custo, como o "salting out", devem ser usados inicialmente, quando o volume total e o número de contaminantes são maiores. Os métodos cromatográficos são, com freqüência, impraticáveis em etapas iniciais, porque a quantidade de meio cromatográfico aumenta com o tamanho da amostra. À medida que cada passo de purificação é completado, o tamanho da amostra geralmente diminui (Tabela 5-5), tornando viável o uso de procedimentos cromatográficos mais sofisticados (e caros) em etapas posteriores.

As proteínas podem ser separadas e caracterizadas por eletroforese

Outra técnica importante para a separação de proteínas é baseada na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico, um processo denominado **eletroforese.** Esses procedimentos em geral não são usados para purificar proteínas em grandes quantidades, porque alternativas mais simples usualmente estão disponíveis e os métodos eletroforéticos com freqüência afetam de forma adversa a estrutura e, portanto, a função das proteínas. A eletroforese é, no entanto, especialmente útil como método analítico. Sua vantagem é que as proteínas podem ser visualizadas e separadas, permitindo a um pesquisador estimar rapidamente o número de proteínas distintas em uma mistura ou o grau de pureza de uma preparação protéica particular. Além disso, a eletroforese permite a determinação de propriedades extremamente importantes de uma proteína, como o seu ponto isoelétrico e o peso molecular aproximado.

A eletroforese de proteínas é geralmente executada em géis de um polímero que apresenta ligações cruzadas, a poliacrilamida (Fig. 5-19). O gel de poliacrilamida age como uma peneira molecular, alentecendo a migração de proteínas na proporção aproximada de sua razão entre a carga e a massa. A migração

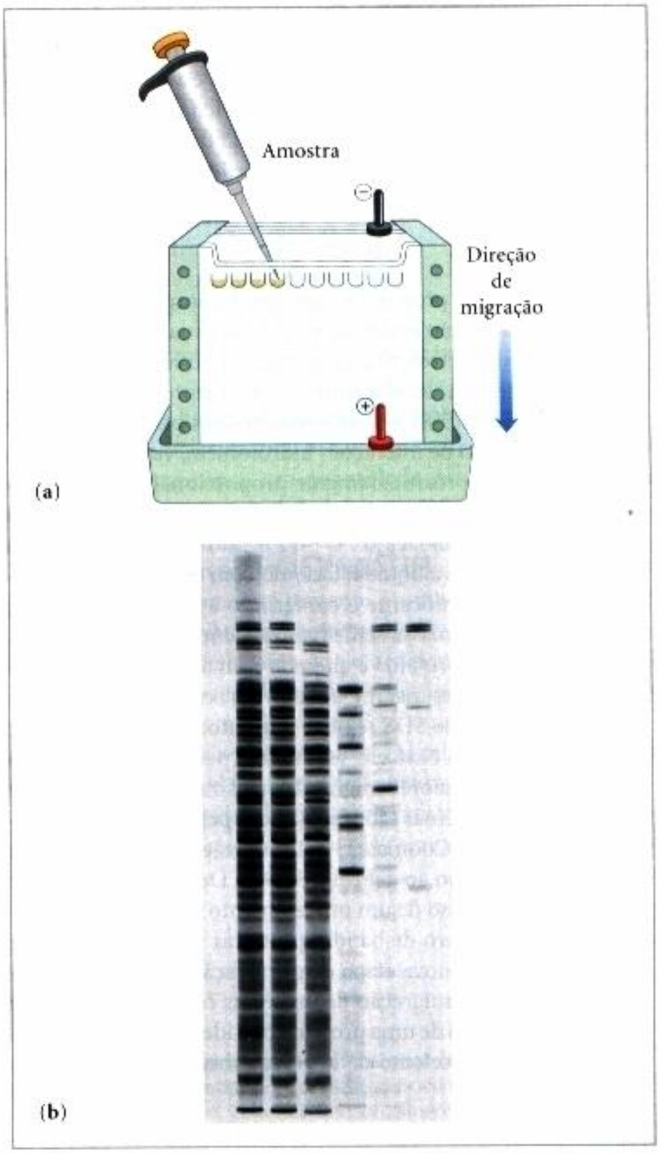


Figura 5-19 – Eletroforese. (**a**) Amostras diferentes são aplicadas em poços ou depressões no topo do gel de poliacrilamida. As proteínas movem-se para o interior do gel quando um campo elétrico é aplicado. O gel minimiza as correntes de convecção provocadas por pequenos gradientes de temperatura, bem como os movimentos protéicos, exceto aqueles induzidos pelo campo elétrico. (**b**) As proteínas podem ser visualizadas após a eletroforese, tratando-se o gel com um corante como o azul Coomassie ("Coomassie blue"), que se liga às proteínas, mas não ao gel. Cada banda no gel representa uma proteína diferente (ou subunidade protéica); proteínas menores movem-se mais rapidamente no gel do que proteínas maiores e, portanto, serão encontradas mais próximas da extremidade inferior do gel. Esse gel ilustra a purificação da enzima RNA polimerase da bactéria *E. coli*. A primeira faixa mostra as proteínas presentes no extrato celular total. As faixas sucessivas (da esquerda para a direita) mostram as proteínas presentes após cada etapa de purificação. A proteína purificada contém quatro subunidades, como pode ser visto na última faixa, à direita.

Tabela 5-5 – Purificação para uma enzima hipotética*

Procedimento ou etapa	Volume da fração (ml)	Proteína total (mg)	Atividade (unidades)	Atividade específica (unidades/mg)
1. Extrato celular total	1.400	10.000	100.000	10
2. Precipitação com sulfato de amônio	280	3.000	96.000	32
3. Cromatografia de troca iônica	90	400	80.000	200
4. Cromatografia de exclusão por tamanho	80	100	60.000	600
5. Cromatografia de afinidade	6	3	45.000	15.000

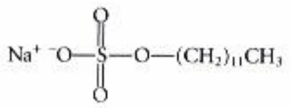
* Todos os valores representam o estado da amostra após a execução do procedimento em questão. A atividade e a atividade específica serão definidas na página 106.

também pode ser afetada pela forma da proteína. Na eletroforese, a força que move a macromolécula é o potencial elétrico, *E*. A mobilidade eletroforética da molécula, μ, é a razão entre a velocidade da partícula, *V*, e o potencial elétrico. A mobilidade eletroforética é também igual à carga líquida da molécula, *Z*, dividida pelo coeficiente friccional, *f*, que reflete em parte a forma de uma proteína. Assim:

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

A migração de uma proteína em um gel durante a eletroforese é, portanto, uma função de seu tamanho e de sua forma.

Um método eletroforético comumente usado para estimar a pureza e o peso molecular utiliza o detergente **dodecil sulfato de sódio (SDS)**. O SDS liga-se à maioria das proteínas (provavelmente por meio de interações hidrofóbicas, veja Capítulo 4), em quantidades aproximadamente proporcionais ao peso molecular da proteína, cerca de uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos. O SDS ligado contribui com uma grande carga negativa líquida, fazendo com que a carga da proteína se torne insignificante e conferindo a cada proteína uma razão entre carga e massa semelhante. Além disso, a conformação nativa de uma proteína é alterada com a ligação do SDS e a maioria das proteínas assume uma forma semelhante. A eletroforese na presença de SDS separa, portanto, as proteínas quase exclusivamente com base em sua massa (peso molecular), com os polipeptídeos menores migrando mais rapidamente. Após a eletroforese, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, como o azul Coomassie ("Coomassie blue"), que se liga às proteínas, mas não ao gel (Fig. 5-19b). Dessa forma, pode-se monitorar o progresso de um procedimento de purificação protéica, já que o número de bandas protéicas visíveis no gel deve diminuir após cada nova etapa de purificação. Quando comparada às posições de migração de proteínas com peso molecular conhecido, a posição de uma proteína não identificada pode prover uma medida excelente de seu peso molecular (Fig. 5-20).



$$Na^+ \ {}^-O-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle O}{\|}}{S}}-O-(CH_2)_{11}CH_3$$

Dodecil sulfato de sódio
(SDS)

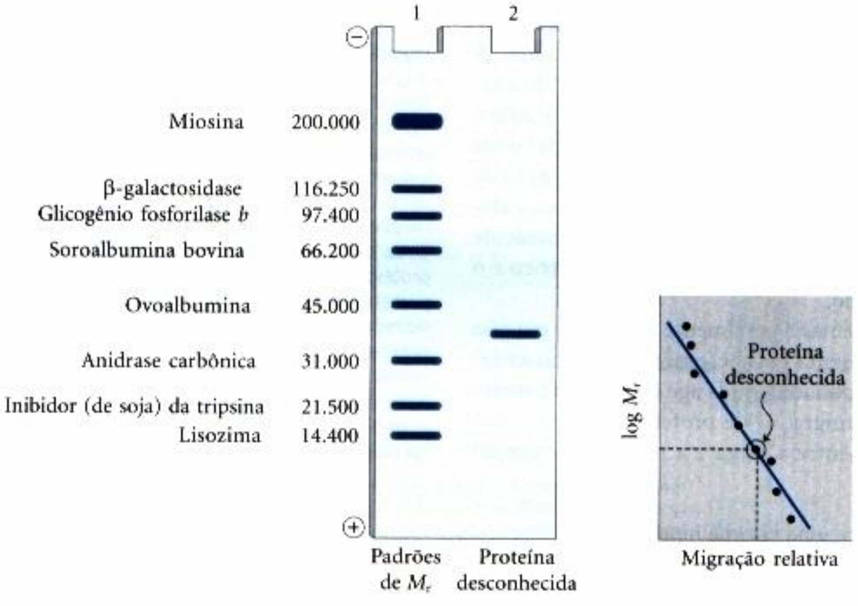
Se a proteína possui duas ou mais subunidades diferentes, as subunidades geralmente serão separadas pelo tratamento com SDS e haverá uma banda distinta para cada uma delas.

A **focalização isoelétrica** é um procedimento utilizado para determinar o ponto isoelétrico (pI) de uma proteína (Fig. 5-21). Um gradiente de pH estabelece-se ao se deixar uma mistura de ácidos e bases orgânicos de baixo peso molecular (anfólitos, veja pág. 95) sob a ação de um campo elétrico ao longo de um gel. Quando uma mistura protéica é aplicada, cada proteína irá migrar até alcançar a região de pH igual ao seu pI (Tabela 5-6). As proteínas com pontos isoelétricos diferentes são, desse modo, distribuídas diferentemente ao longo do gel.

Combinando-se a focalização isoelétrica com a eletroforese na presença de SDS de modo seqüencial em um processo denominado **eletroforese bidimensional**, podem-se resolver misturas complexas de proteínas (Fig. 5-22). Esse é um método analítico mais sensível do que qualquer método eletroforético aplicado de forma isolada. A eletroforese bidimensional separa proteínas de peso molecular idêntico que diferem no valor de seus pI, ou proteínas com valores de pI semelhantes que apresentam pesos moleculares distintos.

Proteínas que não foram separadas podem ser quantificadas

Para purificar uma proteína, é essencial ter uma forma de detectar e quantificar a proteína em presença de diversas outras, em cada etapa do procedimento. Freqüentemente, a purificação ocorre na ausência de quaisquer informações relativas ao tamanho,



(a) (b)

Figura 5-20 – Estimativa do peso molecular de uma proteína. A mobilidade eletroforética de uma proteína em um gel de poliacrilamida que contém SDS é inversamente proporcional ao seu peso molecular, M_r. (**a**) Padrões protéicos de pesos moleculares conhecidos são submetidos à eletroforese (faixa 1). Essas proteínas marcadoras podem ser usadas para estimar o peso molecular de uma proteína desconhecida (faixa 2). (**b**) Um gráfico de log M_r das proteínas marcadoras contra a migração relativa durante a eletroforese é linear, o que permite a leitura, no gráfico, do peso molecular da proteína desconhecida.

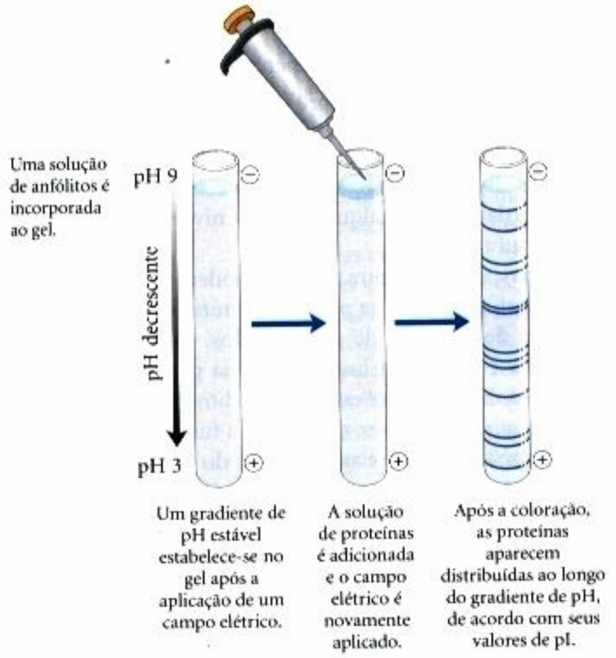

Uma solução de anfólitos é incorporada ao gel.
pH 9
pH decrescente
pH 3
Um gradiente de pH estável estabelece-se no gel após a aplicação de um campo elétrico.
A solução de proteínas é adicionada e o campo elétrico é novamente aplicado.
Após a coloração, as proteínas aparecem distribuídas ao longo do gradiente de pH, de acordo com seus valores de pI.

Figura 5-21 – Focalização isoelétrica. Esta técnica separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos. Um gradiente de pH estável é estabelecido no gel pela adição de anfólitos apropriados. Uma mistura de proteínas é colocada num poço do gel. Quando um campo elétrico é aplicado, as proteínas penetram no gel e migram até alcançar um pH equivalente a seus pI. Lembre-se de que, quando o pH = pI, a carga líquida de uma proteína é zero.

Tabela 5-6 – O ponto isoelétrico de algumas proteínas

Proteína	pI
Pepsina	~1,0
Ovoalbumina	4,6
Soroalbumina	4,9
Urease	5,0
β-Lactoglobulina	5,2
Hemoglobina	6,8
Mioglobina	7,0
Quimotripsinogênio	9,5
Citocromo c	10,7
Lisozima	11,0

às propriedades físicas da proteína ou da fração que ela representa da massa protéica total presente no extrato. Para as proteínas que são enzimas, a sua quantidade em uma determinada solução ou extrato tecidual pode ser medida em termos do efeito catalítico que a enzima produz, ou seja, pelo *aumento* na velocidade pela qual o substrato é convertido em produtos da reação, quando a enzima está presente. Para isso, deve-se conhecer: (1) a equação completa da reação catalisada; (2) um procedimento analítico para a determinação do desaparecimento do substrato ou do aparecimento de produtos reacionais; (3) se a enzima requer co-fatores como íons metálicos ou coenzimas; (4) a dependência da atividade enzimática em relação à concentração de substrato; (5) o pH ótimo; e (6) uma região de temperaturas na qual a enzima é estável e possui elevada atividade. As enzimas são geralmente ensaiadas em seu pH ótimo e em alguma tempe-

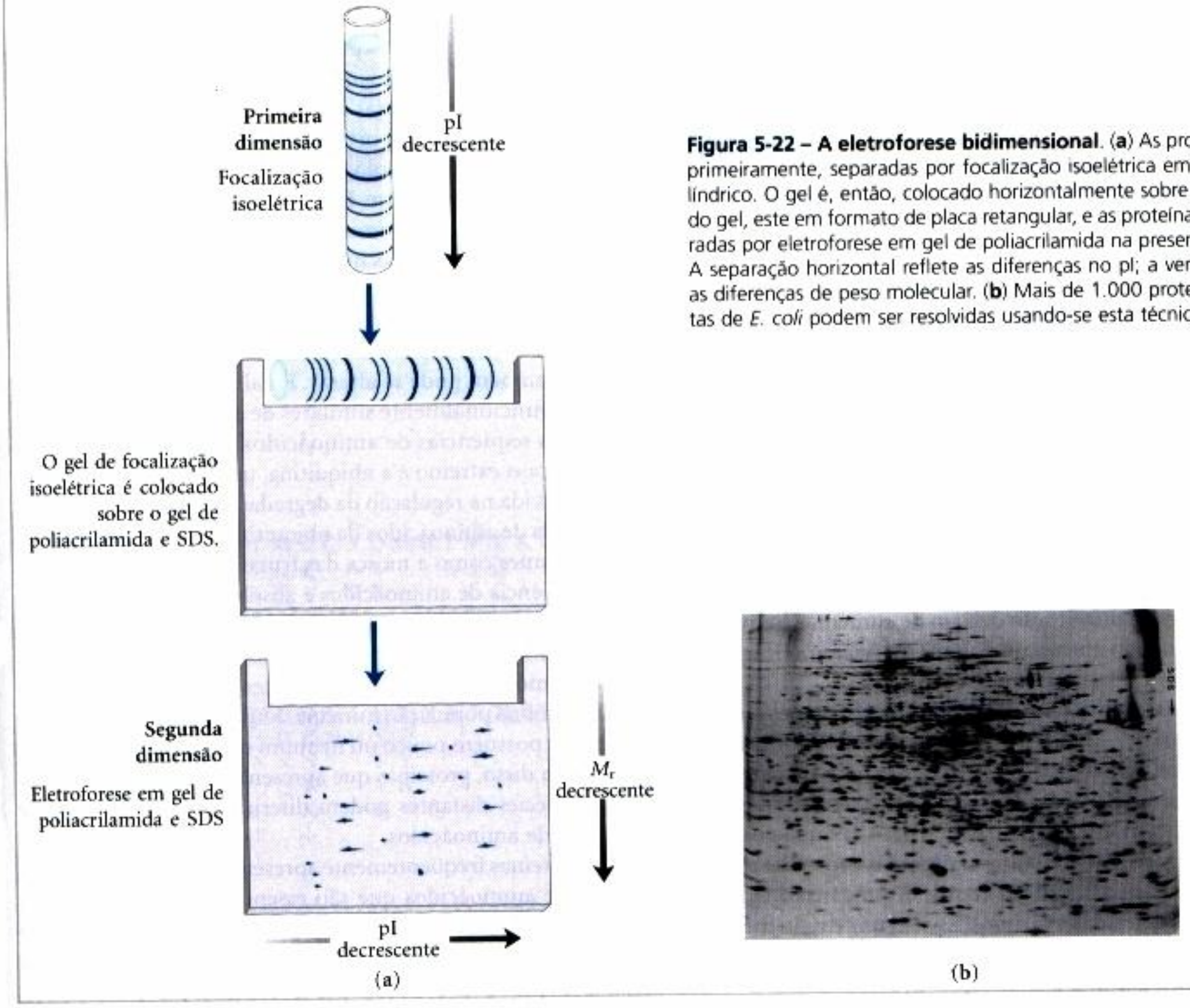

Primeira dimensão
Focalização isoelétrica
pI decrescente
O gel de focalização isoelétrica é colocado sobre o gel de poliacrilamida e SDS.
Segunda dimensão
Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS
M_r decrescente
pI decrescente
(a)
SDS
(b)

Figura 5-22 – A eletroforese bidimensional. (**a**) As proteínas são, primeiramente, separadas por focalização isoelétrica em um gel cilíndrico. O gel é, então, colocado horizontalmente sobre um segundo gel, este em formato de placa retangular, e as proteínas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. A separação horizontal reflete as diferenças no pI; a vertical reflete as diferenças de peso molecular. (**b**) Mais de 1.000 proteínas distintas de *E. coli* podem ser resolvidas usando-se esta técnica.

ratura conveniente, entre 25 e 38°C. Concentrações muito elevadas de substratos são geralmente exigidas, de modo que a velocidade inicial da reação, medida experimentalmente, seja proporcional à concentração enzimática (Capítulo 8).

Por um acordo internacional, 1,0 unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que provoca a transformação de 1 μmol de substrato por minuto a 25°C, sob condições ótimas de medida. O termo **atividade** refere-se ao número total de unidades presentes em uma solução. A **atividade específica** é o número de unidades enzimáticas por miligrama de proteína total (Fig. 5-23). A atividade específica é uma medida da pureza enzimática; ela aumenta durante a purificação de uma enzima, atingindo um máximo quando a enzima está pura (Tabela 5-5).

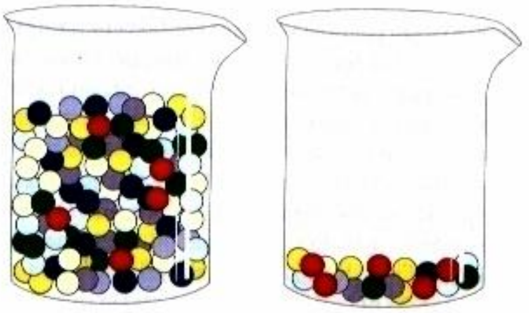


Figura 5-23 – Atividade *versus* atividade específica. A diferença entre esses dois termos pode ser ilustrada, considerando-se dois béqueres que contêm esferas. Os béqueres contêm a mesma quantidade de esferas vermelhas, mas quantidades distintas de esferas de outras cores. Se as esferas representam proteínas, ambos os béqueres contêm a mesma *atividade* da proteína representada pelas esferas vermelhas. O segundo béquer, no entanto, possui uma *atividade específica* maior, pois, aqui, as esferas vermelhas representam uma fração muito maior da quantidade total.

Após cada etapa de purificação, a atividade da preparação (em unidades) é determinada, assim como a quantidade total de proteína; a razão entre as duas fornece a atividade específica. A atividade e a proteína total geralmente diminuem após cada etapa. A atividade reduz-se porque alguma perda sempre ocorre em virtude da inativação ou por interações inadequadas com os materiais cromatográficos ou outras moléculas presentes na solução. A proteína total reduz-se porque o objetivo é remover o máximo possível de proteínas indesejadas ou inespecíficas. Em uma etapa bem-sucedida, a perda de proteínas inespecíficas é muito maior que a perda de atividade; portanto, a atividade específica aumenta mesmo que caia a atividade total. Os dados são tabulados em uma tabela de purificação semelhante à Tabela 5-5. Uma proteína é, geralmente, considerada pura, quando etapas posteriores de purificação deixam de aumentar a atividade específica e quando apenas uma única espécie protéica pode ser detectada (por exemplo, por eletroforese).

Para proteínas que não são enzimas, outros métodos de quantificação são necessários. As proteínas transportadoras podem ser determinadas pela sua ligação à molécula por elas transportadas, e os hormônios e as toxinas, pelo seu efeito biológico; por exemplo, os hormônios de crescimento irão estimular o crescimento de certas células em cultura. Algumas proteínas estruturais representam uma fração tão grande de uma massa tecidual que podem ser extraídas e purificadas sem um ensaio funcional. As possíveis abordagens são tão variadas quanto as próprias proteínas.

A Estrutura Covalente das Proteínas

A purificação de uma proteína é apenas um prelúdio para a dissecação de sua estrutura e função. O que torna uma proteína uma enzima, outra um hormônio, outra uma proteína estrutural e outra, ainda, um anticorpo? Como elas se diferem quimicamente? As distinções mais óbvias são estruturais e estas podem ser abordadas em qualquer um dos níveis estruturais definidos na Figura 5-16.

As diferenças na estrutura primária podem ser especialmente informativas. Cada proteína possui um número e uma seqüência distintos de resíduos de aminoácidos. Como veremos no Capítulo 6, a estrutura primária de uma proteína determina como ela se dobra em uma estrutura tridimensional característica e como isso, por sua vez, determina a função da proteína. A estrutura primária torna-se agora o foco do restante deste capítulo. Inicialmente, consideraremos os indícios experimentais que correlacionam a seqüência e a função protéica, depois descreveremos como a seqüência de aminoácidos é determinada e, finalmente, resumiremos a aplicação prática dessa informação.

A função de uma proteína depende de sua seqüência de aminoácidos

A bactéria *E. coli* produz mais de 3.000 proteínas diferentes; um ser humano produz entre 50.000 e 100.000. Em ambos os casos, cada tipo de proteína possui uma estrutura tridimensional característica que lhe confere uma função específica. Cada tipo de proteína também possui uma seqüência característica de aminoácidos. A intuição nos sugere que a seqüência de aminoácidos deva ter um papel fundamental na determinação da estrutura tridimensional da proteína e, em última análise, de sua função, mas será que essa expectativa é correta? Examinando rapidamente como varia a seqüência de aminoácidos das proteínas, podem-se ter evidências empíricas que auxiliam a substanciar o relacionamento importante existente entre a seqüência de aminoácidos e a função biológica. Inicialmente, conforme já observamos, as proteínas com funções distintas sempre possuem diferentes seqüências de aminoácidos. Em segundo lugar, milhares de doenças genéticas humanas são decorrentes de proteínas defeituosas. Talvez um terço dessas proteínas é defeituoso por causa de uma única alteração em sua seqüência de aminoácidos; desse modo, se a estrutura primária se altera, a função da proteína também pode se alterar. Finalmente, ao se comparar proteínas funcionalmente similares de espécies diferentes, encontramos seqüências de aminoácidos semelhantes (Adendo 5-2). Um caso extremo é a ubiquitina, uma proteína de 76 resíduos envolvida na regulação da degradação de outras proteínas. A seqüência de aminoácidos da ubiquitina é idêntica em espécies tão distantes como a mosca das frutas e os seres humanos.

A seqüência de aminoácidos é absolutamente fixa ou invariante para uma proteína particular? Não; alguma flexibilidade é possível. Estima-se que 20% a 30% das proteínas em humanos sejam **polimórficas**, possuindo variantes em suas seqüências de aminoácidos na população humana. Muitas dessas variações nas seqüências possuem pouco ou nenhum efeito na função da proteína. Além disso, proteínas que apresentam funções semelhantes em espécies distantes podem diferir muito em tamanho e seqüência de aminoácidos.

As proteínas freqüentemente apresentam regiões em sua seqüência de aminoácidos que são essenciais para suas funções biológicas. A seqüência de aminoácidos em outras regiões pode variar consideravelmente, sem afetar essas funções. A fração da seqüência que é crítica varia de proteína para proteína, dificul-

Adendo 5-2 Homologia de proteínas entre as espécies

Proteínas homólogas são proteínas relacionadas evolutivamente. Elas geralmente têm a mesma função em espécies diferentes; um exemplo é o **citocromo *c***, uma proteína mitocondrial que contém ferro e transfere elétrons durante oxidações biológicas em células eucarióticas. As proteínas homólogas de espécies diferentes podem ter cadeias polipeptídicas idênticas ou quase idênticas em extensão. Muitas posições na seqüência de aminoácidos são ocupadas pelos mesmos resíduos em todas as espécies, sendo estes denominados **resíduos invariantes**. Outras posições apresentam variações consideráveis nos resíduos de aminoácidos de uma espécie a outra, sendo estes denominados **resíduos variáveis**.

O significado funcional da homologia de seqüências é bem ilustrado pelo citocromo *c* (M_r ~13.000), que possui cerca de 100 aminoácidos na maioria das espécies. As seqüências de aminoácidos das moléculas de citocromo *c* de muitas espécies diferentes foram determinadas e 27 posições na cadeia são invariantes em todas as espécies testadas (Fig. 1), sugerindo que eles são os resíduos mais importantes na atribuição da função biológica dessa proteína. Os resíduos em outras posições apresentam algumas variações interespécies. Há nítidas gradações no número de diferenças observadas nos resíduos variáveis. Em algumas posições, a maioria das substituições envolve resíduos de aminoácidos similares (por exemplo, a Arg positivamente carregada poderia substituir a Lys também positivamente carregada); essas são as denominadas **substituições conservadoras**. Em outras posições, as substituições são menos restritas (não-conservadoras). Como mostraremos no próximo capítulo, as cadeias polipeptídicas das proteínas enovelam-se em conformações características e específicas, que dependem da seqüência de aminoácidos. Claramente, os resíduos invariantes são mais críticos para a estrutura e a função de uma proteína que os variáveis. O reconhecimento de quais resíduos pertencem a cada categoria é uma etapa importante para decifrar a complexa questão de como a seqüência de aminoácidos se traduz em uma estrutura tridimensional específica.

Os aminoácidos variáveis fornecem outro tipo de informação. As relações filogenéticas (evolucionárias), baseadas em métodos taxonômicos, têm sido testadas e experimentalmente confirmadas pela bioquímica. O exame das seqüências do citocromo *c* e de outras proteínas homólogas levou a uma conclusão importante: o número de resíduos que diferem em proteínas homólogas de duas espécies quaisquer é proporcional à diferença filogenética entre essas espécies; por exempo, 48 resíduos de aminoácidos diferem nas moléculas de citocromo *c* do cavalo e da levedura, que são espécies bem distanciadas, enquanto apenas dois resíduos diferem nas moléculas de citocromo *c* do frango e do pato, espécies bem mais próximas entre si. De fato, o citocromo *c* possui seqüências de aminoácidos idênticas no frango e no peru, e nos suínos, bovinos e ovelhas. A informação sobre o número de diferenças nos resíduos entre proteínas homólogas de espécies diferentes permite a construção de árvores evolucionárias que mostram a origem e a seqüência do aparecimento de espécies diferentes durante o curso da evolução (Fig. 2, p. 108). As relações estabelecidas pela taxonomia anatômica e bioquímica são bastante concordantes entre si.

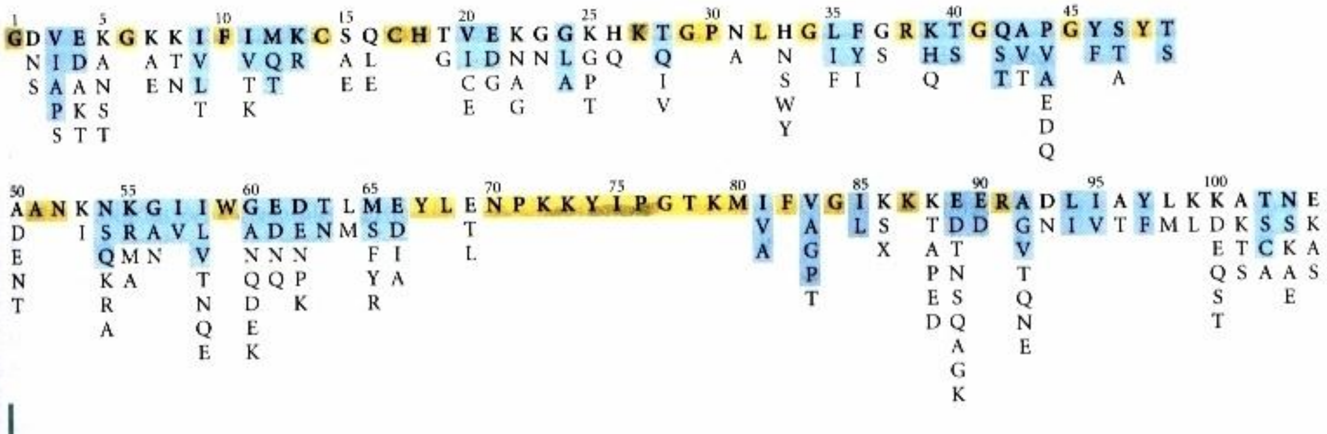

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45
G D V E K G K K I F I M K C S Q C H T V E K G G K H K T G P N L H G L F G R K T G Q A P G Y S Y T
N I D A A T V V Q R A L G I D N N L G Q Q A N I Y S H S S V V F T S
S A A N E N L T T E E C G A A P I S F I Q T T A A
P K S T K E G T V W E
S T T Y D
Q
50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
A A N K N K G I I W G E D T L M E Y L E N P K K Y I P G T K M I F V G I K K K E E R A D L I A Y L K K A T N E
D I S R A V L A D E N M S D T V A L S T D D G N I V T F M L D K S S K
E Q M N V N N N F I L A G X A T V E T C K A
N K A T Q Q P Y A P P N T Q S A A S
T R N D K R T E S Q S E
A Q E D Q N T
E K A E
G
K

Figura 1 – Seqüência de aminoácidos do citocromo *c* humano. As substituições de aminoácidos em outras espécies estão listadas abaixo dos resíduos individuais. Os aminoácidos invariantes estão sombreados em amarelo, as substituições conservadoras estão sombreadas em azul, e as substituições não-conservadoras não estão sombreadas. X é um aminoácido não habitual, a trimetilisina. As abreviaturas de uma letra para os aminoácidos aparecem na Tabela 5-1, pág. 90.

Continua na página seguinte

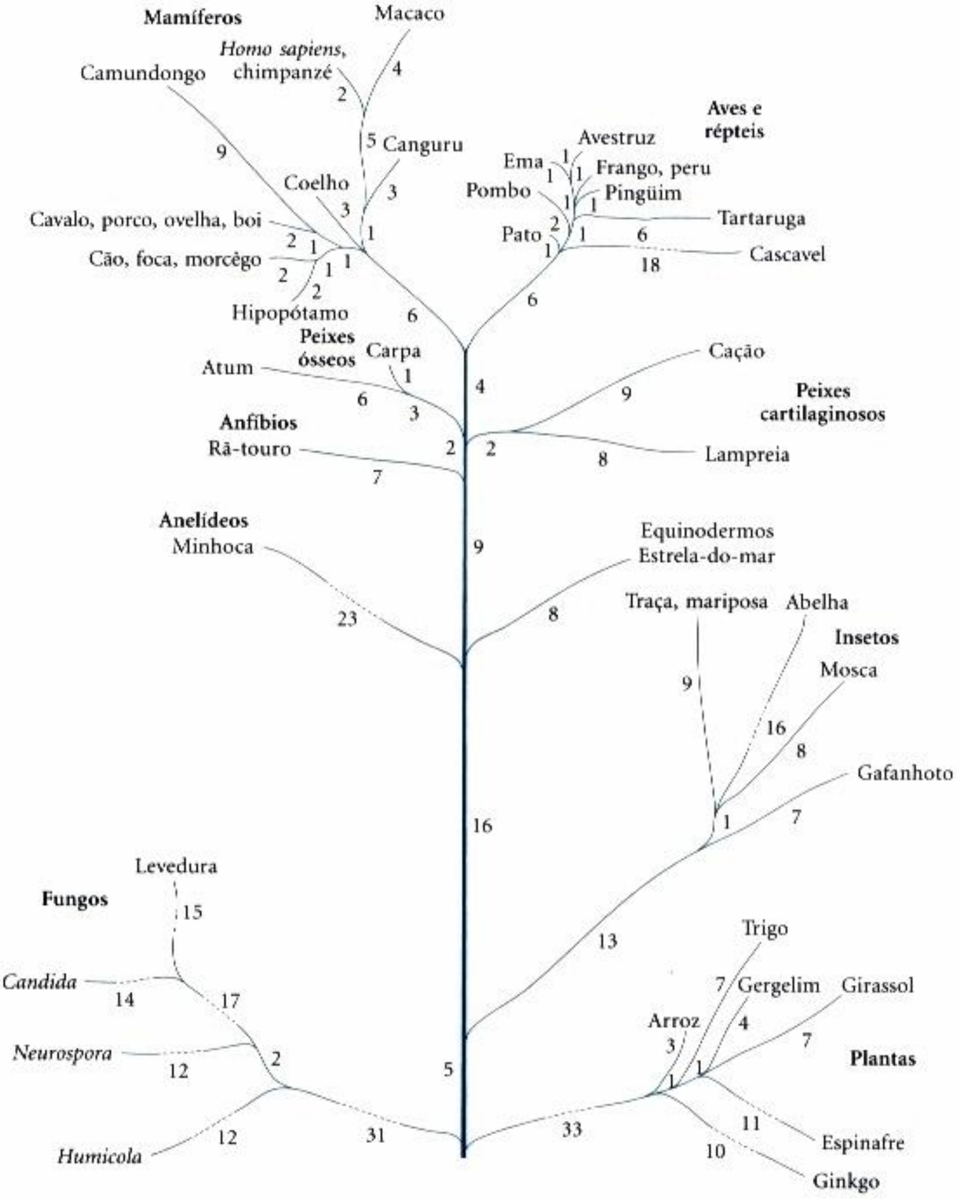

Mamíferos
Macaco
Homo sapiens, chimpanzé
Camundongo
4
2
5
Canguru
9
Coelho
3
3
Cavalo, porco, ovelha, boi
1
2
1
Cão, foca, morcêgo
1
1
2
2
Hipopótamo
6
Aves e répteis
Avestruz
Ema
1
1
1
Frango, peru
Pombo
Pingüim
1
1
Tartaruga
Pato
2
1
1
6
Cascavel
18
6
Peixes ósseos
Carpa
Atum
1
6
3
4
Cação
9
Peixes cartilaginosos
Anfíbios
Rã-touro
2
2
7
8
Lampreia
Anelídeos
Minhoca
9
Equinodermos Estrela-do-mar
23
8
Traça, mariposa
Abelha
Insetos
Mosca
9
16
8
Gafanhoto
16
1
7
Levedura
Fungos
15
13
Trigo
Candida
14
17
7
Gergelim
Girassol
Arroz
4
3
7
Neurospora
12
2
5
1
1
Plantas
12
31
33
11
Espinafre
Humicola
10
Ginkgo

Figura 2 – Ramificações principais da árvore evolucionária dos eucariotos, construída a partir do número de diferenças de aminoácidos existente entre as moléculas de citocromo c de diversas espécies. Os números representam o número de resíduos pelos quais o citocromo c de uma dada linha de organismos difere de seu ancestral. Os pontos de ramificação refletem um ancestral comum.

tando a tarefa de relacionar a seqüência com a estrutura tridimensional e a estrutura com a função. Antes de avançarmos nessa questão, devemos considerar como a informação sobre as seqüências é obtida.

As seqüências de aminoácidos de numerosas proteínas já foram determinadas

Duas descobertas fundamentais ocorridas em 1953 foram de importância fundamental na história da bioquímica. Naquele ano, James D. Watson e Francis Crick deduziram a estrutura em dupla hélice do DNA e propuseram uma base estrutural para a sua replicação precisa (Capítulo 10). Sua proposta trouxe à luz a realidade molecular encoberta sob a idéia de um gene. No mesmo ano, Frederick Sanger revelou a seqüência de resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas do hormônio insulina (Fig. 5-24), surpreendendo muitos investigadores que de há muito acreditavam que a elucidação da seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo seria uma tarefa impossível. Rapidamente, tornou-se evidente que a seqüência de nucleotídeos no DNA e a seqüência de aminoácidos nas proteínas se relacionavam de alguma forma. Cerca de uma década após essas descobertas, o papel da seqüência de nucleotídeos do DNA na determinação da seqüência de aminoácidos das moléculas protéicas foi desvendado (Capítulo 27).

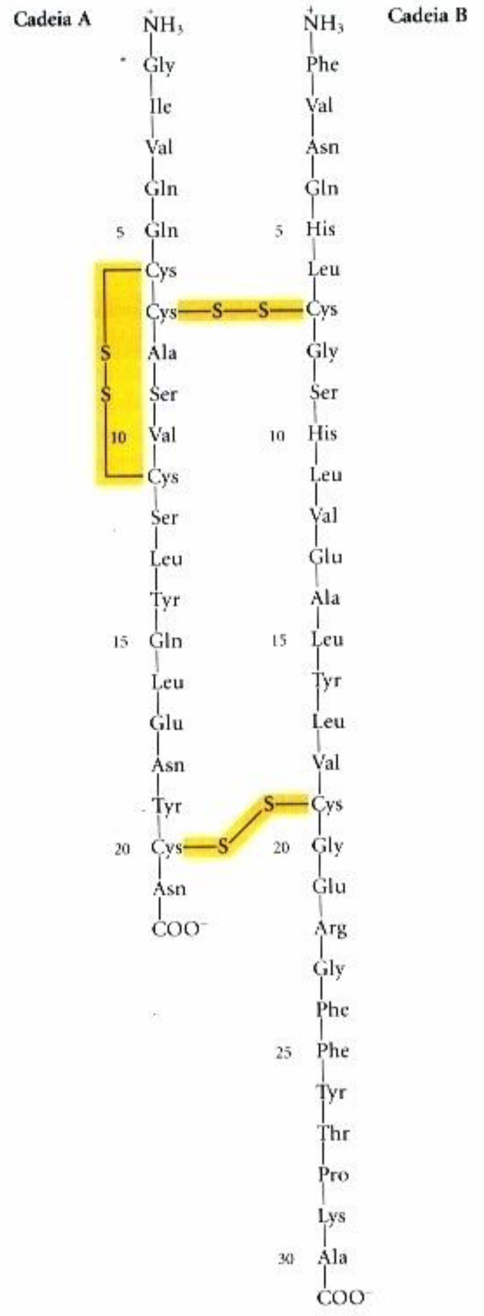


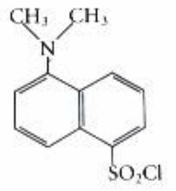
Figura 5-24 – Seqüência de aminoácidos da insulina bovina. As duas cadeias polipeptídicas são unidas por ligações dissulfeto. A cadeia A é idêntica em insulinas de humanos, suínos, cães, coelhos e cachalotes. As cadeias B de bovinos, suínos, cães, cabras e cavalos são idênticas. Tais identidades entre proteínas similares de espécies distintas são discutidas no Adendo 5-2.

As seqüências de aminoácidos de milhares de proteínas diferentes pertencentes a muitas espécies têm sido determinadas, utilizando-se os princípios primeiramente desenvolvidos por Sanger. Esses métodos ainda hoje são utilizados, embora com diversas variantes e aperfeiçoamentos nos seus detalhes. O seqüenciamento químico de proteínas atualmente complementa uma relação crescente de métodos mais recentes, que fornecem muitos caminhos para se obter dados de seqüências de aminoácidos. Esses dados são, hoje em dia, fundamentais para todas as áreas da investigação bioquímica.

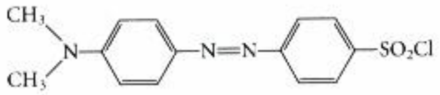
Polipeptídeos pequenos são seqüenciados por procedimentos automatizados

Diversos procedimentos são utilizados para analisar a estrutura primária das proteínas. Um deles consiste em hidrolisar a proteína e determinar sua composição de aminoácidos (Fig. 5-25a). Essa informação é freqüentemente valiosa para a interpretação dos resultados obtidos por outros procedimentos. Como a composição de aminoácidos difere de uma proteína à outra, ela pode servir como um tipo de "impressão digital". Pode ser usada, por exemplo, para auxiliar na determinação da identidade ou não de proteínas isoladas por laboratórios distintos. A hidrólise, por si só, não pode, no entanto, ser usada para determinar a *seqüência* de aminoácidos em uma proteína.

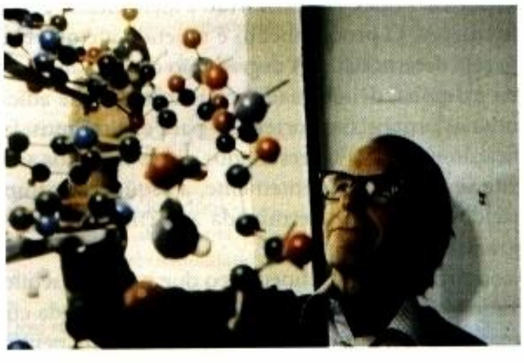
Um procedimento com freqüência usado conjuntamente com a hidrólise é a marcação e a identificação do resíduo de aminoácido aminoterminal (Fig. 5-25b). Para esse propósito, Sanger desenvolveu o reagente 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB). Outros reagentes usados na marcação do resíduo aminoterminal, o cloreto de dansila e o cloreto de dabsila, produzem derivados que são mais facilmente detectados que os derivados dinitrofenil. Após a marcação do aminoterminal com um desses reagentes, o polipeptídeo é hidrolisado a seus aminoácidos constituintes e o aminoácido marcado é identificado. Como a etapa de hidrólise destrói o polipeptídeo, esse procedimento não pode ser utilizado para seqüenciar um polipeptídeo além de seu resíduo aminoterminal. Entretanto, pode auxiliar na determinação do número de polipeptídeos quimicamente distintos em uma proteína, desde que cada um tenha um resíduo aminoterminal distinto. Por exemplo, dois resíduos — Phe e Gly — seriam marcados se a insulina (Fig. 5-24) fosse submetida a esse procedimento.



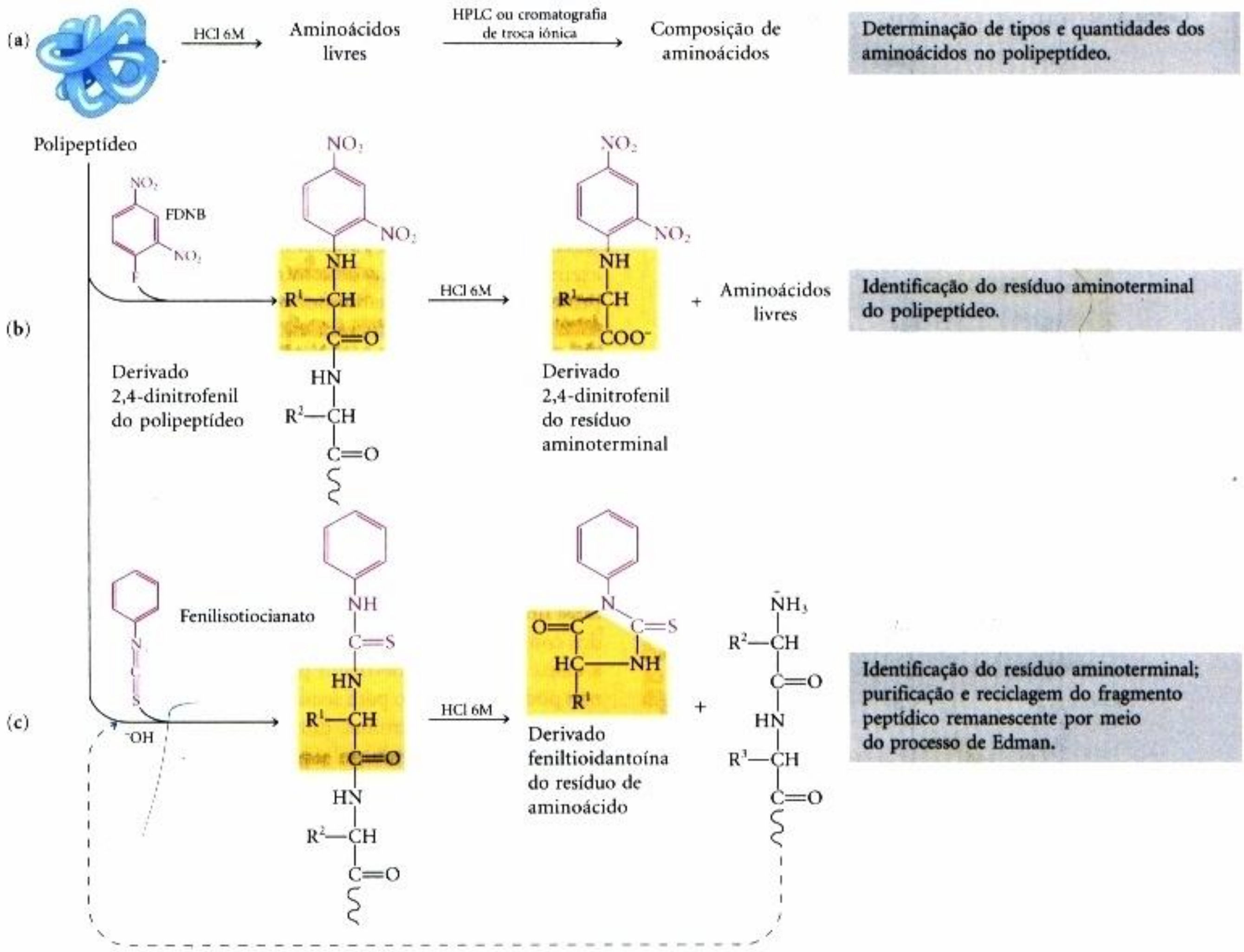
Cloreto de dansila



Cloreto de dabsila



Frederick Sanger


(a)
HCl 6M
Aminoácidos livres
HPLC ou cromatografia de troca iônica
Composição de aminoácidos
Polipeptídeo
(b)
FDNB
NO_2
F
NH
R^1—CH
C=O
HN
R^2—CH
Derivado 2,4-dinitrofenil do polipeptídeo
HCl 6M
COO^-
Derivado 2,4-dinitrofenil do resíduo aminoterminal
+
Aminoácidos livres
(c)
Fenilisotiocianato
N
C
S
$^-$OH
C=S
HCl 6M
O=C
HC—NH
R^1
Derivado feniltioidantoína do resíduo de aminoácido
NH_3
R^3—CH

Determinação de tipos e quantidades dos aminoácidos no polipeptídeo.

Identificação do resíduo aminoterminal do polipeptídeo.

Identificação do resíduo aminoterminal; purificação e reciclagem do fragmento peptídico remanescente por meio do processo de Edman.

Figura 5-25 – Etapas do seqüenciamento de um polipeptídeo. (**a**) Determinação da composição de aminoácidos e (**b**) identificação do resíduo aminoterminal são, com freqüência, as primeiras etapas no seqüenciamento de um polipeptídeo. O método de Sanger para identificar o resíduo aminoterminal é mostrado aqui. A degradação de Edman (**c**) revela a seqüência completa de um peptídeo. Para peptídeos curtos, esse método é capaz de, por si só, revelar a seqüência completa, sendo as etapas (**a**) e (**b**) freqüentemente omitidas. Esses dois procedimentos são úteis para o caso de polipeptídeos maiores, que são geralmente fragmentados em peptídeos menores para o seqüenciamento (veja Fig. 5-27).

Para seqüenciar inteiramente um polipeptídeo, geralmente se utiliza um procedimento químico elaborado por Pehr Edman. A **degradação de Edman** marca e remove apenas o resíduo aminoterminal de um peptídeo, deixando as demais ligações peptídicas intactas (Fig. 5-25c). O peptídeo reage com fenilisotiocianato e o resíduo aminoterminal é removido no fim, na forma do derivado feniltioidantoína. Após a remoção e a identificação do resíduo aminoterminal, o *novo* resíduo aminoterminal agora exposto pode ser marcado, removido e identificado pela mesma série de reações. O procedimento é repetido até que toda a seqüência seja determinada. A degradação de Edman é executada em uma máquina, denominada **seqüenciador**, que adiciona os reagentes nas proporções corretas, separa os produtos, faz a sua identificação e registra os resultados. Esses métodos são extremamente sensíveis. Freqüentemente, a seqüência completa de aminoácidos pode ser determinada a partir de apenas alguns microgramas de proteína.

O comprimento do polipeptídeo que pode ser seqüenciado com exatidão pela degradação de Edman depende da eficiência das etapas químicas individuais. Consideremos um peptídeo que começa com a seqüência Gly–Pro–Lys em seu aminoterminal. Se a glicina for removida com 97% de eficiência, 3% das moléculas do polipeptídeo em solução reterão um resíduo de Gly em seu aminoterminal. No segundo ciclo de Edman, 97% dos aminoácidos liberados serão prolinas e 3% serão glicinas, enquanto 3% das moléculas reterão resíduos de Gly (0,1%) ou Pro (2,9%) em seus aminoterminais. Em cada ciclo, os peptídeos que não reagiram em ciclos anteriores contribuirão com aminoácidos para um ruído de fundo cada vez maior, tornando eventualmente impossível determinar qual será o próximo aminoácido na seqüência do peptídeo original. Os seqüenciadores modernos atingem eficiências de mais de 99% por ciclo, permitindo o seqüenciamento de mais de 50 resíduos de aminoácidos contíguos em um polipeptídeo. A estrutura primária da insulina, obtida por Sanger e colaboradores em um período de 10 anos, pode ser hoje completamente determinada em um ou dois dias.

Grandes proteínas devem ser seqüenciadas em segmentos menores

A exatidão global do seqüenciamento de aminoácidos geralmente diminui à medida que o comprimento da cadeia polipeptídica aumenta. Os peptídeos muito grandes encontrados nas proteínas devem ser quebrados em pedaços menores para ser seqüenciados eficientemente. Há várias etapas nesse processo. Inicialmente, a proteína é clivada em um conjunto de fragmentos específicos por uma série de métodos químicos ou enzimáticos. Se existirem ligações dissulfeto, estas devem ser rompidas. Cada fragmento é, a seguir, purificado e seqüenciado pelo procedimento de Edman. Finalmente, a ordem em que os fragmentos aparecem na proteína original é determinada e as ligações dissulfeto (se existirem) são localizadas.

Rompendo as ligações dissulfeto. As ligações dissulfeto interferem com o procedimento de seqüenciamento. Um resíduo de cistina (Fig. 5-7) que tem uma de suas ligações peptídicas clivadas pelo procedimento de Edman pode permanecer ligado a outra fita polipeptídica por sua ligação dissulfeto. As ligações dissulfeto também interferem com a clivagem enzimática ou química do polipeptídeo. Duas abordagens para o rompimento irreversível das ligações dissulfeto são resumidas na Figura 5-26.

Clivagem da cadeia polipeptídica. Diversos métodos podem ser usados para fragmentar a cadeia polipeptídica. Enzimas, denominadas **proteases**, catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas. Algumas proteases clivam apenas a ligação peptídica adjacente a resíduos particulares de aminoácidos (Tabela 5-7), podendo, assim, clivar um polipeptídeo de modo previsível e reprodutível. Diversos reagentes químicos também clivam a ligação peptídica adjacente a resíduos específicos.

Entre as proteases, a enzima digestiva tripsina catalisa a hidrólise apenas das ligações peptídicas cujo grupo carbonila pertença a um resíduo de Lys ou Arg, independentemente do comprimento ou da seqüência de aminoácidos da cadeia. O número de peptídeos menores produzidos pela clivagem com tripsina pode, dessa forma, ser previsto a partir do número total de resíduos de Lys ou Arg no polipeptídeo original, que pode ser determinado a partir da hidrólise da amostra intacta (Fig. 5-27). Um polipeptídeo que contenha cinco resíduos de Lys e/ou Arg geralmente produzirá seis peptídeos menores após a clivagem com tripsina. Além disso, todos eles, exceto um, terão uma Lys ou uma Arg carboxiterminal. Os fragmentos produzidos pela ação da tripsina (ou por outro método químico ou enzimático) podem ser separados por métodos cromatográficos ou eletroforéticos.

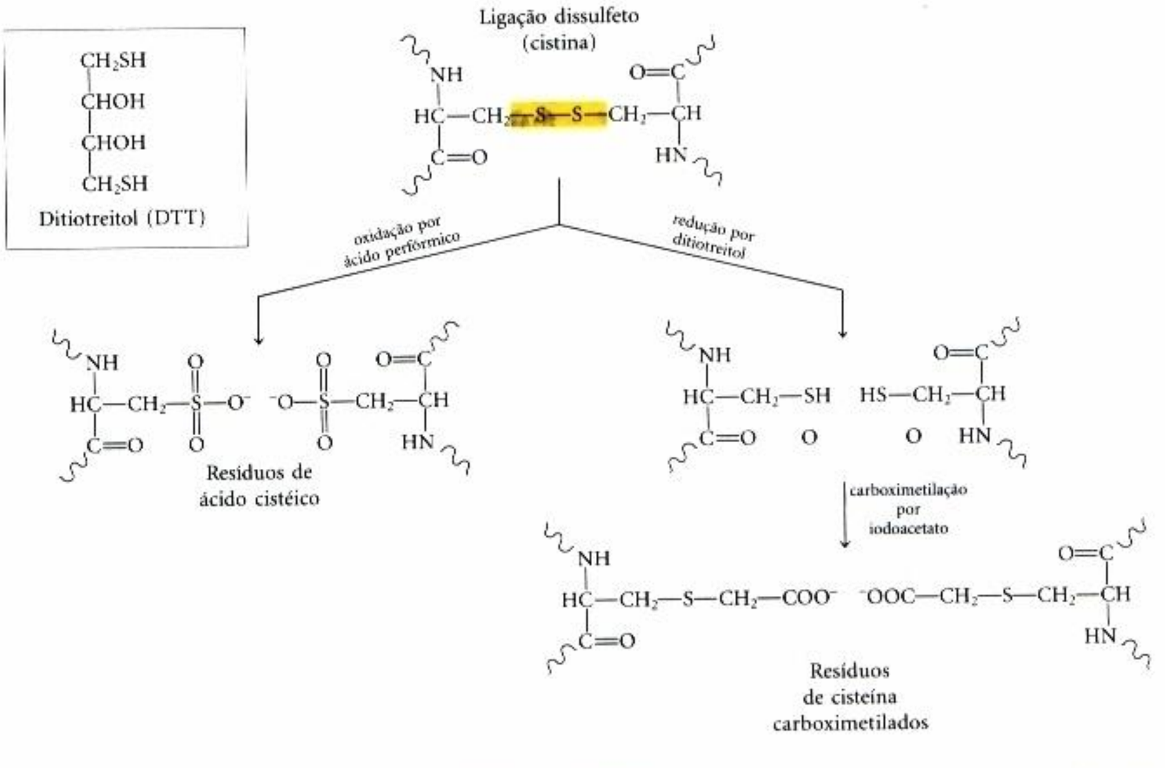
Tabela 5-7 – A especificidade de alguns métodos freqüentemente usados para a fragmentação de cadeias polipeptídicas

Tratamento*	Pontos de clivagem†
Tripsina	Lys, Arg (C)
Protease de *Submaxillarus*	Arg (C)
Quimotripsina	Phe, Trp, Tyr (C)
Protease V8 de *Staphylococcus aureus*	Asp, Glu (C)
Protease Asp-*N*	Asp, Glu (N)
Pepsina	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C	Lys (C)
Brometo de cianogênio	Met (C)

* À exceção do brometo de cianogênio, todas as substâncias são proteases. Todas são disponíveis em fontes comerciais.

† Resíduos que fornecem o ponto primário de reconhecimento para a protease ou reagente; a clivagem da ligação peptídica ocorre no lado carbonila (C) ou amino (N) dos resíduos de aminoácidos indicados.

Seqüenciamento de peptídeos. Cada fragmento peptídico resultante da ação da tripsina é seqüenciado separadamente pelo procedimento de Edman.



CH₂SH
CHOH
CHOH
CH₂SH
Ditiotreitol (DTT)
Ligação dissulfeto
(cistina)
oxidação por ácido perfórmico
redução por ditiotreitol
Resíduos de ácido cistéico
carboximetilação por iodoacetato
Resíduos de cisteína carboximetilados

Figura 5-26 – O rompimento das ligações dissulfeto nas proteínas. Dois métodos comuns estão ilustrados. A oxidação dos resíduos de cistina com ácido perfórmico produz dois resíduos de ácido cistéico. A redução com ditiotreitol para formar resíduos de Cys deve ser seguida por outra modificação dos grupos —SH reativos, para prevenir uma nova formação de ligações dissulfeto. A carboximetilação pelo iodoacetato é uma reação que pode ser utilizada para tal propósito.

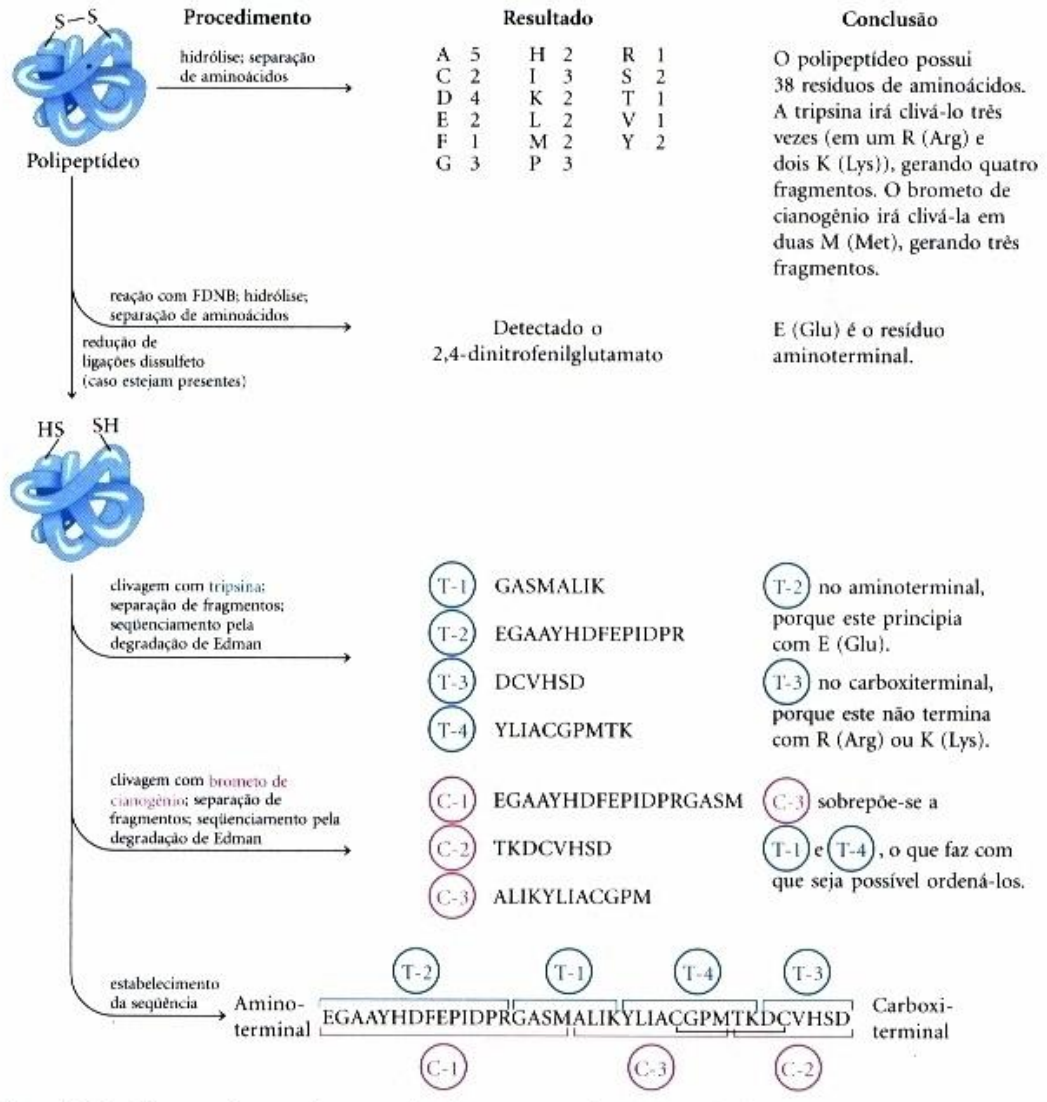

S—S
Procedimento
Resultado
Conclusão
hidrólise; separação de aminoácidos
A 5
C 2
D 4
E 2
F 1
G 3
H 2
I 3
K 2
L 2
M 2
P 3
R 1
S 2
T 1
V 1
Y 2
O polipeptídeo possui 38 resíduos de aminoácidos. A tripsina irá clivá-lo três vezes (em um R (Arg) e dois K (Lys)), gerando quatro fragmentos. O brometo de cianogênio irá clivá-la em duas M (Met), gerando três fragmentos.
Polipeptídeo
reação com FDNB; hidrólise; separação de aminoácidos
Detectado o 2,4-dinitrofenilglutamato
E (Glu) é o resíduo aminoterminal.
redução de ligações dissulfeto (caso estejam presentes)
HS
SH
clivagem com tripsina; separação de fragmentos; seqüenciamento pela degradação de Edman
T-1 GASMALIK
T-2 EGAAYHDFEPIDPR
T-3 DCVHSD
T-4 YLIACGPMTK
T-2 no aminoterminal, porque este principia com E (Glu).
T-3 no carboxiterminal, porque este não termina com R (Arg) ou K (Lys).
clivagem com brometo de cianogênio; separação de fragmentos; seqüenciamento pela degradação de Edman
C-1 EGAAYHDFEPIDPRGASM
C-2 TKDCVHSD
C-3 ALIKYLIACGPM
C-3 sobrepõe-se a T-1 e T-4, o que faz com que seja possível ordená-los.
estabelecimento da seqüência
Amino-terminal
T-2
T-1
T-4
T-3
EGAAYHDFEPIDPRGASMALIKYLIACGPMTKDCVHSD
Carboxi-terminal
C-1
C-3
C-2

Figura 5-27 – Clivagem de proteínas e seqüenciamento e ordenamento dos fragmentos peptídicos. Inicialmente, a composição de aminoácidos e o resíduo aminoterminal de uma amostra intacta são determinados. Em seguida, quaisquer ligações dissulfeto são rompidas antes da fragmentação, de modo que o seqüenciamento possa prosseguir eficientemente. Neste exemplo, existem apenas dois resíduos de Cys (C), de modo que há apenas uma única possibilidade de localização da ligação dissulfeto. Em polipeptídeos com três ou mais resíduos de Cys, a posição das ligações dissulfeto pode ser determinada conforme descrito no texto. (As abreviaturas de uma letra para os aminoácidos são mostradas na Tabela 5-1.)

Ordenamento dos fragmentos peptídicos. A ordem dos fragmentos trípticos no polipeptídeo original deve ser determinada. Outra amostra da cadeia polipeptídica original é clivada em fragmentos, usando-se outra enzima ou reagente que clivem ligações peptídicas em outras posições distintas das efetuadas pela tripsina. Por exemplo, o brometo de cianogênio cliva apenas as ligações peptídicas nas quais o grupo carbonila se origina da metionina. Os fragmentos resultantes desse segundo procedimento são, a seguir, separados e seqüenciados como anteriormente.

As seqüências de aminoácidos de cada fragmento obtido pelos dois procedimentos de clivagem são examinadas, com o objetivo de se encontrar peptídeos derivados do segundo procedimento cujas seqüências estabeleçam uma continuidade, em razão das sobreposições, entre os fragmentos obtidos pelo primeiro procedimento de clivagem (Fig. 5-27). Os peptídeos sobreponíveis, obtidos na segunda fragmentação, fornecem a ordem correta dos fragmentos peptídicos produzidos pela primeira. Se o aminoácido aminoterminal foi identificado antes da clivagem original da proteína, essa informação pode ser usada para estabelecer qual fragmento é derivado do aminoterminal. Os dois conjuntos de fragmentos podem ser comparados, para se verificar a existência de possíveis erros na determinação da seqüência de aminoácidos de cada fragmento.

Se o segundo procedimento de clivagem não permite estabelecer a continuidade dentre todos os peptídeos da primeira clivagem, um terceiro ou mesmo um quarto método deve ser empregado, para se obter um conjunto de peptídeos que possa fornecer a(s) sobreposição(ões) necessária(s).

Localização das ligações dissulfeto. Se a estrutura primária incluir ligações dissulfeto, suas localizações podem ser determinadas em uma etapa adicional após o seqüenciamento estar completo. Uma amostra da proteína é novamente clivada com um reagente como a tripsina, dessa vez sem o rompimento prévio das ligações dissulfeto. Quando os peptídeos resultantes são separados por eletroforese e comparados com o conjunto original de peptídeos gerados pela tripsina, para cada ligação dissulfeto, dois dos peptídeos originais estarão ausentes e um novo peptídeo, de maior tamanho, surgirá. Os dois peptídeos ausentes representam as regiões do polipeptídeo intacto, as quais são unidas por ligações dissulfeto.

As seqüências de aminoácidos também podem ser deduzidas por outros métodos

A abordagem anteriormente resumida não é a única forma de se determinar seqüências de aminoácidos. Novos métodos baseados na espectrometria de massa permitem o seqüenciamento de peptídeos curtos (20 a 30 aminoácidos) em apenas alguns minutos (Adendo 5-3). Além disso, o desenvolvimento de métodos rápidos de seqüenciamento de DNA (Capítulo 10), a elucidação do código genético (Capítulo 27) e o desenvolvimento de técnicas para o isolamento de genes (Capítulo 29) tornam possível deduzir a seqüência de um polipeptídeo a partir da determinação da seqüência de nucleotídeos no gene que o codifica (Fig. 5-28). As técnicas usadas para determinar seqüências de proteínas e de DNA são complementares. Quando o gene está disponível, o seqüenciamento do DNA pode ser mais rápido e mais exato que o seqüenciamento de uma proteína. A maioria das proteínas é hoje em dia seqüenciada dessa forma indireta. Se o gene não for isolado, o seqüenciamento direto de peptídeos é necessário, e isso pode fornecer informações (por exemplo, a localização de ligações dissulfeto) que não estão disponíveis em uma seqüência de DNA. Além disso, mesmo um conhecimento parcial da seqüência de aminoácidos facilita enormemente o isolamento do gene correspondente (Capítulo 29).

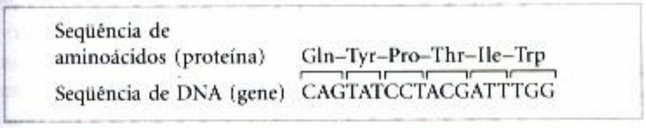


Figura 5-28 – Correspondência entre as seqüências de DNA e de aminoácidos. Cada aminoácido é codificado por uma seqüência específica de três nucleotídeos no DNA. O código genético é descrito em detalhes no Capítulo 27.

O conjunto de métodos hoje em dia disponíveis para analisar tanto proteínas como ácidos nucléicos aponta para uma nova disciplina de bioquímica celular. A seqüência completa do DNA de um organismo, seu genoma (Tabela 1-1), está agora disponível para organismos que variam desde vírus e bactérias até eucariotos multicelulares. Os genes têm sido descobertos aos milhares, incluindo muitos que codificam proteínas sem funções conhecidas. A fim de descrever todo o perfil protéico codificado pelo DNA de um organismo, os pesquisadores cunharam o termo **proteoma**. A análise do proteoma de uma célula é um auxiliar cada vez mais importante e informativo para a totalização de sua seqüência genômica. As proteínas de uma célula são separadas e mostradas pela eletroforese bidimensional (Fig. 5-22). As manchas relativas a proteínas individuais podem ser extraídas desses géis. Peptídeos de pequeno tamanho, derivados das proteínas, são seqüenciados por espectrometria de massa (Adendo 5-3) e essas seqüências são comparadas com a seqüência genômica para identificar a proteína. Freqüentemente, o conhecimento da seqüência de um segmento de seis a oito resíduos de aminoácidos é suficiente para indicar o gene, codificando a proteína toda. Inevitavelmente, algumas dessas proteínas já são conhecidas e possuem funções bastante estudadas; outras são mais misteriosas. Quando a maioria das proteínas é relacionada com um gene, as alterações no perfil protéico devidas a alterações ambientais, nutricionais ou ocasionadas por estresse ou doenças podem ser examinadas. Esses estudos podem fornecer evidências para o papel de proteínas cujas funções são ainda desconhecidas. Eventualmente, tais estudos poderão complementar os estudos sobre o metabolismo celular intermediário e o metabolismo de ácidos nucléicos, para fornecer um quadro novo e cada vez mais completo da bioquímica em relação às células e até mesmo aos organismos.

Adendo 5-3

Investigando proteínas com a espectrometria de massa

O espectrômetro de massa tem sido uma ferramenta indispensável na química. As moléculas a serem analisadas são inicialmente ionizadas no vácuo. Quando as moléculas, agora carregadas, são introduzidas em um campo elétrico e/ou magnético, suas trajetórias através do campo são uma função de sua razão massa/carga, *m/z*. Esta propriedade mensurável das espécies iônicas pode ser usada para deduzir a massa (*M*) da substância a ser analisada com grande precisão.

Embora a espectrometria de massa esteja em uso há vários anos, ela não podia ser aplicada a macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos. As determinações de *m/z* são feitas em moléculas na fase gasosa, e o calor ou outro tratamento necessário para levar uma macromolécula para a fase gasosa geralmente causava sua rápida decomposição. Em 1988, duas técnicas diferentes foram desenvolvidas para superar essa dificuldade. Em uma delas, as proteínas são colocadas em uma matriz que absorve luz. Com um breve pulso de luz "laser", as proteínas são ionizadas e, em seguida, dessorvidas da matriz, indo ao sistema a vácuo. Esse processo, denominado **espectrometria de massa por dessorção/ionização a "laser" assistido por uma matriz** ou **MALDI MS**, foi utilizado com sucesso na determinação da massa de diversas macromoléculas. Em um segundo e igualmente bem-sucedido método, as macromoléculas em solução são forçadas diretamente da fase líquida para a fase gasosa. Uma solução de moléculas a serem analisadas atravessa uma agulha carregada que é mantida em elevado potencial elétrico, dispersando a solução em um fino aerossol de microgotas carregadas. O solvente que envolve as macromoléculas rapidamente se evapora e os íons macromoleculares com cargas múltiplas são introduzidos na fase gasosa, sem serem destruídos. Essa técnica é denominada **espectrometria de massa por ionização e eletropulverização** ou **ESI MS**. Prótons adicionados durante a passagem pela agulha fornecem cargas adicionais à macromolécula. A razão *m/z* da molécula pode ser analisada na câmara a vácuo.

A espectrometria de massa fornece uma abundante informação para a pesquisa proteômica, para a enzimologia e para a química de proteínas em geral. As técnicas necessitam apenas de quantidades

Continua na página seguinte

minúsculas de amostra, de modo que podem ser facilmente aplicadas a pequenas quantidades de proteínas extraídas de géis eletroforéticos bidimensionais. A medida precisa da massa molecular de uma proteína é um dos parâmetros críticos em sua identificação. Uma vez que a massa de uma proteína seja precisamente conhecida, a espectrometria de massa é um método exato e conveniente para detectar alterações na massa devidas à presença de co-fatores e íons metálicos ligados à proteína, às modificações covalentes e a outras causas.

O processo para determinar a massa de uma proteína com o ESI MS é ilustrado na Figura 1. À medida que é injetada na fase gasosa, a proteína adquire um número variável de prótons e, dessa forma, cargas positivas do solvente. Isso cria um espectro com diferentes razões massa/carga. Cada pico sucessivo corresponde a uma espécie que difere da do pico vizinho por uma diferença de razão massa/carga igual a 1 (1 próton). A massa da proteína pode ser determinada a partir de dois picos vizinhos quaisquer. A m/z determinada de um pico é

$$(m/z)_2 = \frac{M + n_2 X}{n_2}$$

onde M é a massa da proteína, n_2 é o número de cargas e X é a massa dos grupos adicionados (prótons, neste caso). De modo semelhante, para os picos vizinhos,

$$(m/z)_1 = \frac{M + (n_2 + 1)X}{n_2 + 1}$$

Agora temos duas incógnitas (M e n_2) e duas equações. Podemos resolver inicialmente o valor de n_2 e depois o de M:

$$n_2 = \frac{(m/z)_2 - X}{(m/z)_2 - (m/z)_1}$$

$$M = n_2[(m/z)_2 - X]$$

O cálculo que utiliza os valores de m/z de dois picos quaisquer em um espectro, como o mostrado na Figura 1b, geralmente fornecerá a massa da proteína (neste caso, aerolisina k; 47.342 Da) com um erro de apenas ±0,01%. A partir da geração de vários conjuntos de picos, repetições dos cálculos e tomando-se as respectivas médias, os resultados podem ser ainda mais exatos para o cálculo de M. Algoritmos computacionais podem transformar o espectro m/z em um único pico que também fornece uma medida muito exata da massa (Fig. 1b, inserção).

A espectrometria de massa também pode ser usada para seqüenciar pequenos trechos de um polipeptídeo, uma aplicação que surgiu como uma ferramenta valiosa para identificar rapidamente proteínas desconhecidas. A informação relativa à seqüência é obtida usando-se uma técnica denominada **MS seqüencial** ou **MS/MS**. Uma solução que contém a proteína sob investigação é inicialmente tratada com uma protease ou reagente químico, a fim de reduzi-la, por clivagem hidrolítica, a uma mistura de peptídeos mais curtos. A mistura é, a seguir, injetada em um instrumento constituído essencialmente por dois espectrômetros de massa em seqüência (Fig. 2a, parte superior). No primeiro, a mistura peptídica é separada e os fragmentos ionizados são manipulados de modo que apenas um dos diversos tipos de peptídeos produzidos por clivagem possa emergir na outra extremidade. A molécula do peptídeo selecionado, que possui uma carga em alguma posição ao longo de sua extensão, percorre uma câmara a vácuo entre os dois espectrômetros de massa. Nessa célula de colisão, o peptídeo é fragmentado ainda mais por impactos de elevada energia com um "gás de colisão", uma pequena quantidade de um gás nobre como o hélio ou o argônio que é injetado no interior da câmara a vácuo. Esse procedimento é de-

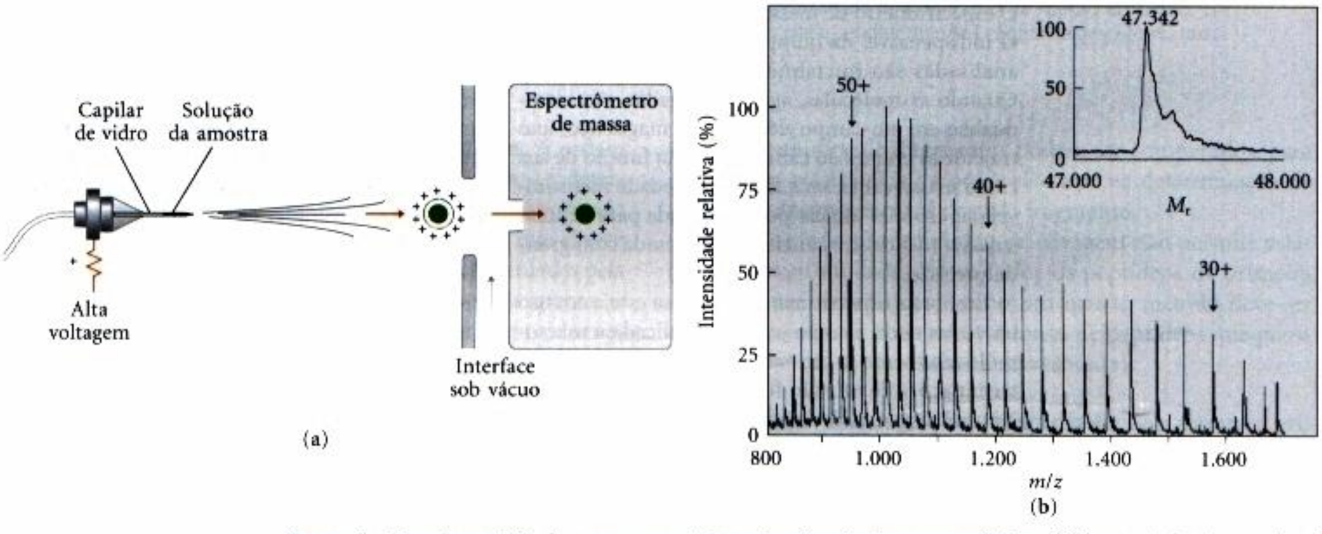


Figura 1 – Espectrometria de massa por eletropulverização de uma proteína. (**a**) Uma solução de proteína é dispersa em gotas altamente carregadas por passagem através de uma agulha sob a influência de um campo elétrico de alta voltagem. As gotas evaporam e os íons (com prótons adicionados, neste caso) penetram no espectrômetro de massa para a determinação de m/z. O espectro gerado (**b**) é uma família de picos, com cada pico sucessivo (da direita para a esquerda) correspondendo a uma espécie carregada, acrescida de uma unidade de massa e de carga. Uma transformação produzida em computador é mostrada na inserção.

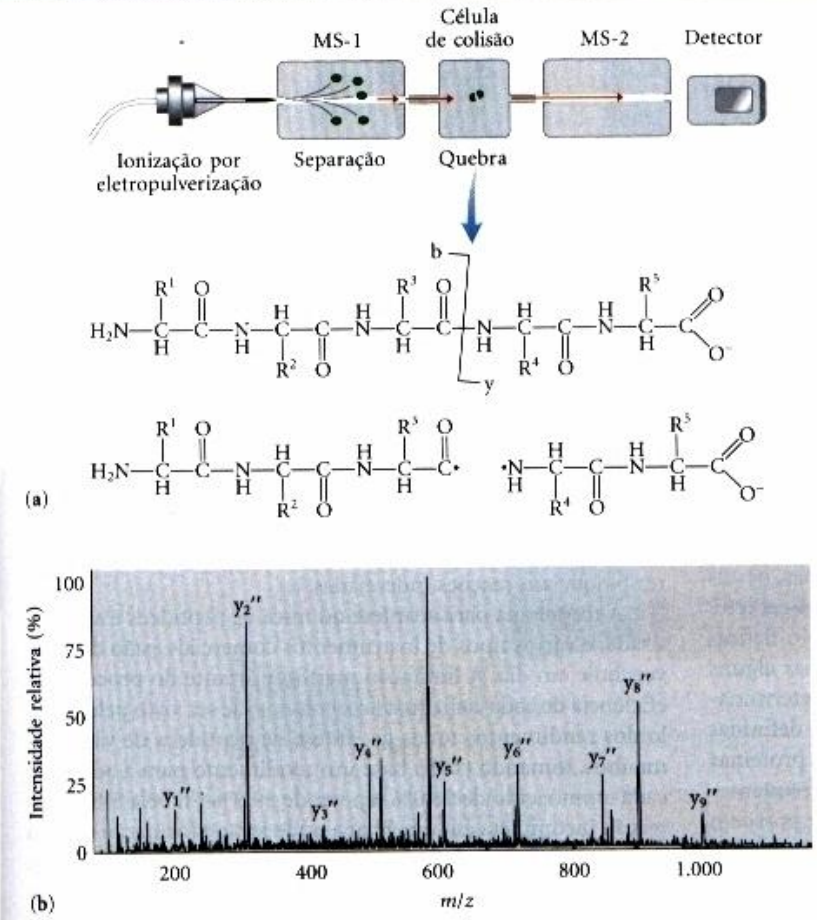


Figura 2 – Obtendo informações sobre seqüências de proteínas com a espectrometria de massa seqüencial. (**a**) Após a hidrólise proteolítica, uma solução protéica é injetada em um espectrômetro de massa (MS-1). Os peptídeos distintos são selecionados de forma que apenas um tipo seja escolhido para a análise subseqüente. O peptídeo selecionado é fragmentado novamente em uma câmara entre os dois espectrômetros de massa, e a razão *m/z* para cada fragmento é medida no segundo espectrômetro de massa (MS-2). Muitos dos íons gerados durante essa segunda fragmentação resultam do rompimento da ligação peptídica, como mostrado. Estes são denominados íons tipo b ou tipo y, dependendo de a carga ter sido retida no lado aminoterminal ou carboxiterminal, respectivamente. (**b**) Um espectro típico com picos que representam os fragmentos peptídicos gerados a partir de uma amostra de um peptídeo curto (10 resíduos). Os picos marcados são íons tipo y. O pico de elevada intensidade, próximo a y_5'', é um íon duplamente carregado e não faz parte do conjunto y. Os picos sucessivos se diferem pela massa de um aminoácido particular no peptídeo original. Neste caso, a seqüência deduzida foi Phe–Pro–Gly–Gln–(Ile/Leu)–Asn–Ala–Asp–(Ile/Leu)–Arg. Note a ambigüidade entre os resíduos de Ile e Leu devido ao fato de ambos possuírem a mesma massa molecular. Neste exemplo, o conjunto de picos derivados dos íons do tipo y predominam e, como resultado, o espectro é muito simplificado. Isso se deve ao fato de que um resíduo de Arg ocorre no carboxiterminal do peptídeo e a maior parte das cargas positivas é retida nesse resíduo.

senhado para fragmentar muitas moléculas do peptídeo da amostra, com cada peptídeo sendo clivado em apenas um local, em média. A maioria das quebras ocorre em ligações peptídicas. A fragmentação não envolve a adição de água (é realizada em quase vácuo), de modo que os produtos podem incluir radicais moleculares como os radicais carbonila (Fig. 2a, parte inferior). A carga do peptídeo original é retida em um dos fragmentos gerados a partir dele.

O segundo espectrômetro de massa mede as razões *m/z* de todos os fragmentos carregados (fragmentos não-carregados não são detectados). Isso gera um ou mais conjuntos de picos. Um dado conjunto de picos (Fig. 2b) consiste de todos os fragmentos carregados que foram gerados pelo rompimento do mesmo tipo de ligação (mas em diferentes pontos do peptídeo) e derivados do mesmo lado da quebra da ligação, seja o carboxiterminal ou o aminoterminal. Cada pico sucessivo em um determinado conjunto possui um aminoácido a menos que o pico anterior. A diferença na massa de pico para pico identifica o aminoácido que foi perdido em cada caso, revelando, dessa forma, a seqüência do peptídeo. As únicas ambigüidades envolvem a leucina e a isoleucina, que possuem a mesma massa.

A carga no peptídeo pode ser retida no fragmento carboxiterminal ou no fragmento aminoterminal, e outras ligações, além da ligação peptídica, podem ser rompidas no processo de fragmentação, resultando em múltiplos conjuntos de picos. Os conjuntos mais proeminentes consistem dos fragmentos carregados derivados da ruptura das ligações peptídicas. O conjunto de picos relativos aos fragmentos carboxiterminais pode ser distinguido sem ambigüidade dos picos relativos aos fragmentos aminoterminais. Como as ligações rompidas entre os espectrômetros (na célula de colisão) não geram grupos carboxila ou amino completos nos sítios de rompimento, os únicos grupos α-amino e α-carboxila intactos nos fragmentos peptídicos são os das extremidades (Fig. 2a). Os dois conjuntos de fragmentos podem ser determinados pelas ligeiras diferenças de massa. A seqüência de aminoácidos derivada de um conjunto pode ser confirmada pelo outro, aumentando a confiança na informação obtida, relativa às seqüências.

Mesmo uma seqüência curta é geralmente suficiente para permitir uma associação, sem ambigüidades, de uma proteína com o seu gene, se a seqüência gênica for conhecida. O seqüenciamento pela espectrometria de massa não pode substituir o procedimento da degradação de Edman para o seqüenciamento de peptídeos extensos, mas é ideal para a pesquisa proteômica que objetiva a catalogação das centenas de proteínas celulares que possam ser separadas em um gel bidimensional. Nas décadas vindouras, dados detalhados de seqüências genômicas estarão disponíveis para centenas, eventualmente milhares de organismos. A habilidade de associar proteína com genes de forma rápida, utilizando a espectrometria de massa, facilitará enormemente a exploração desse extraordinário recurso informacional.

A seqüência de aminoácidos fornece importantes informações bioquímicas

O conhecimento da seqüência de aminoácidos de uma proteína nos permite ter uma idéia sobre sua estrutura e função, sua localização celular e evolução, obtidas, sobretudo, a partir de pesquisas de similaridade com outras seqüências conhecidas. Milhares de seqüências são conhecidas e estão disponíveis em bancos de dados acessíveis pela internet. A comparação de uma seqüência recém-obtida com esses grandes bancos de seqüências armazenadas revela, com freqüência, relacionamentos surpreendentes e esclarecedores.

Não se compreende, em detalhes, a maneira exata de como a seqüência de aminoácidos determina a estrutura tridimensional, também não é sempre possível predizer a função a partir da seqüência. No entanto, famílias de proteínas que possuem características estruturais ou funcionais comuns podem ser facilmente identificadas com base nas similaridades de suas seqüências de aminoácidos. As proteínas individuais são associadas às famílias, baseando-se no grau de similaridade na seqüência de aminoácidos. Os membros de uma família geralmente são idênticos em 25% ou mais de suas seqüências, e as proteínas, nessas famílias, geralmente compartilham ao menos algumas características funcionais e estruturais. Algumas famílias são definidas, no entanto, por identidades que envolvem apenas alguns resíduos de aminoácidos que são críticos para uma determinada função. Diversas subestruturas similares (a serem definidas no Capítulo 6 como "domínios") ocorrem em muitas proteínas funcionalmente não relacionadas. Esses domínios freqüentemente se enovelam em configurações estruturais que possuem um grau não costumeiro de estabilidade ou que são especializadas para um certo ambiente. As relações evolucionárias podem ser também deduzidas a partir de similaridades estruturais e funcionais existentes nas famílias de proteínas.

Certas seqüências de aminoácidos atuam freqüentemente como sinais que determinam a localização celular, as modificações químicas e a meia-vida de uma proteína. Seqüências sinalizadoras especiais, geralmente localizadas na extremidade aminoterminal, são usadas para direcionar certas proteínas para serem exportadas pela célula, enquanto outras proteínas são direcionadas para distribuição ao núcleo, à superfície celular, ao citosol e a outras localizações celulares. Outras seqüências atuam como sítios de ancoragem para grupos prostéticos, tais como grupos de açúcares nas glicoproteínas e de lipídios nas lipoproteínas. Alguns desses sinais são bem caracterizados e podem ser facilmente reconhecidos, caso ocorram em seqüências de proteínas recém-caracterizadas.

Peptídeos pequenos e proteínas podem ser sintetizados quimicamente

Diversos peptídeos são potencialmente úteis como agentes farmacológicos, e sua produção é de considerável importância comercial. Há três formas de se obter um peptídeo: (1) por purificação a partir de um tecido, uma tarefa freqüentemente dificultada pelas pequenas quantidades que podem ser obtidas, dada a baixa concentração de alguns peptídeos; (2) pela engenharia genética (Capítulo 29); ou (3) pela síntese química direta. As técnicas poderosas disponíveis atualmente tornam a síntese química direta uma opção atraente em muitos casos. Além de sua importância comercial, a síntese de porções peptídicas específicas de grandes proteínas é uma ferramenta de crescente importância para o estudo da estrutura e da função das proteínas.

A complexidade das proteínas torna as abordagens sintéticas tradicionais da química orgânica impraticáveis para peptídeos com mais de quatro ou cinco resíduos de aminoácidos. Um dos problemas é a dificuldade de purificar o produto após cada etapa.

R. Bruce Merrifield

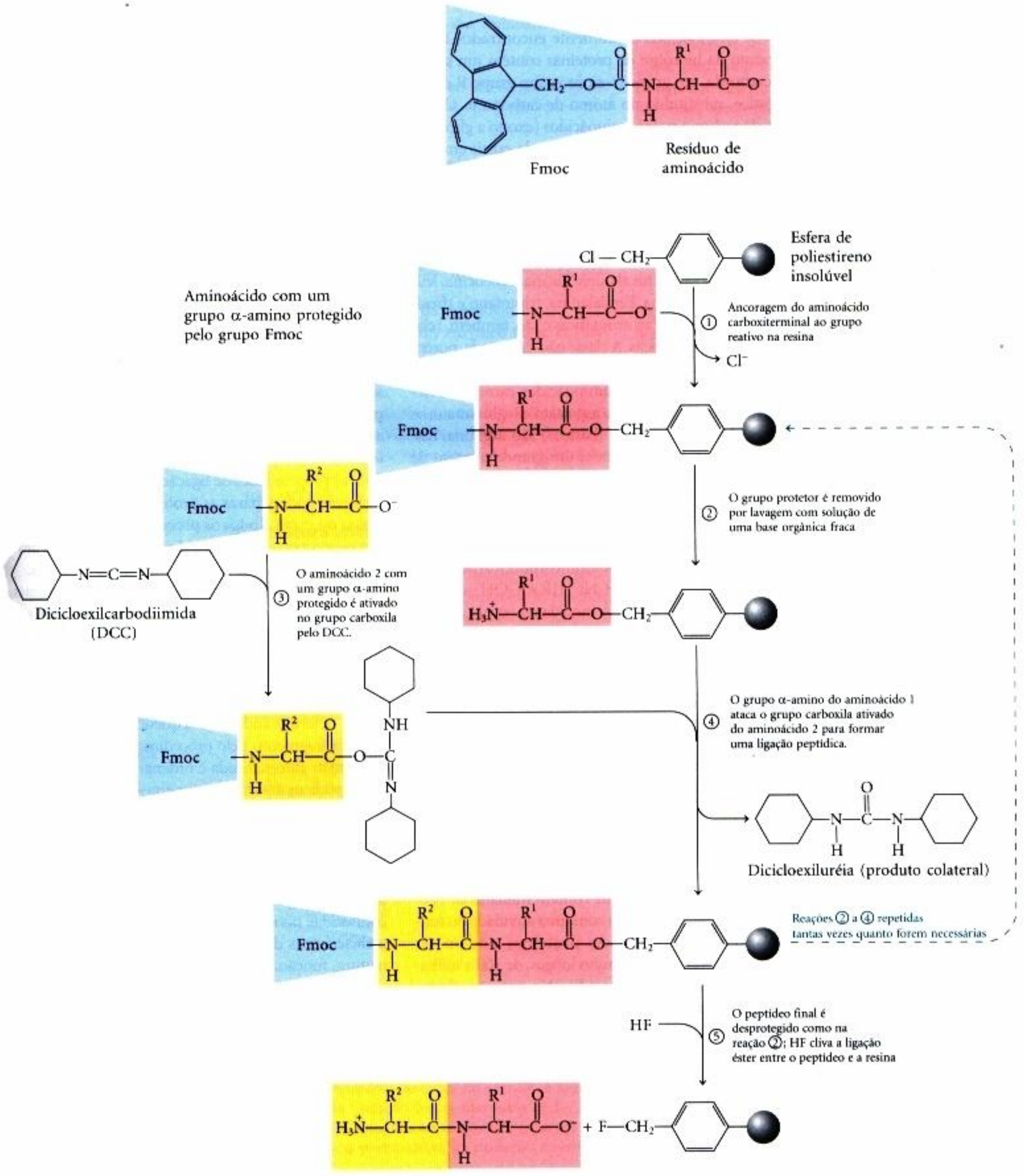
A principal descoberta tecnológica nesse campo foi feita por Bruce Merrifield em 1962. Sua inovação envolvia a síntese de um peptídeo, mantendo-o ancorado por uma extremidade a um suporte sólido. O suporte consiste de um polímero insolúvel (resina) contido em uma coluna similar às utilizadas para procedimentos cromatográficos. O peptídeo é sintetizado gradualmente nesse suporte, um aminoácido de cada vez, utilizando-se um conjunto-padrão de reações em um ciclo repetitivo (Fig. 5-29). Em cada etapa sucessiva do ciclo, grupos químicos protetores bloqueiam reações indesejadas.

A tecnologia para a síntese química de peptídeos é automatizada, e vários tipos de instrumentos comerciais estão disponíveis hoje em dia. A limitação mais importante do processo é a eficiência de cada ciclo químico, como pode ser visto pelo cálculo dos rendimentos totais da síntese de peptídeos de vários tamanhos, tomando como base um rendimento para a adição de cada aminoácido de 96,0% em vez de 99,8% (Tabela 5-8). Uma reação incompleta em uma etapa pode levar à formação de uma impureza (na forma de um peptídeo curto) na etapa seguinte. As condições de ocorrência das reações químicas foram otimizadas para permitir a síntese de proteínas com 100 resíduos de aminoácidos em alguns dias, com rendimento razoável. Uma abordagem muito semelhante foi utilizada para sintetizar ácidos nucléicos (veja Fig. 10-37). É importante observar que essa tecnologia, impressionante por si só, é muito rudimentar, quando comparada aos processos biológicos. A mesma proteína de 100 aminoácidos seria sintetizada com uma enorme fidelidade em cerca de 5 segundos, em uma célula bacteriana.

Tabela 5-8 – Efeito dos rendimentos parciais sobre o rendimento total na síntese de peptídeos

Número de resíduos no polipeptídeo final	Rendimento total do peptídeo final (%) quando o rendimento de polipeptídeo final de cada etapa for:	
	96,0%	99,8%
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1,7	82

Diversos métodos para unir eficientemente os peptídeos tornaram possível a construção de grandes proteínas a partir de peptídeos sintéticos. Com esses métodos, novas formas de proteínas podem ser criadas com grupos químicos precisamente posicionados, incluindo-se os que não são normalmente encontrados em uma proteína celular. Essas novas formas de proteínas permitem novas maneiras de se testar teorias de catálise enzimática, criar proteínas com propriedades químicas novas e projetar seqüências protéicas que se enovelarão em estruturas particulares. Esta última aplicação fornece um teste definitivo para nossa crescente habilidade de relacionar a estrutura primária de um peptídeo com a estrutura tridimensional que assumirá em solução. No próximo capítulo, veremos as estruturas protéicas de ordem mais altas.


Fmoc
Resíduo de aminoácido
Esfera de poliestireno insolúvel
Cl — CH₂
Aminoácido com um grupo α-amino protegido pelo grupo Fmoc
① Ancoragem do aminoácido carboxiterminal ao grupo reativo na resina
Cl⁻
② O grupo protetor é removido por lavagem com solução de uma base orgânica fraca
Dicicloexilcarbodiimida (DCC)
③ O aminoácido 2 com um grupo α-amino protegido é ativado no grupo carboxila pelo DCC.
④ O grupo α-amino do aminoácido 1 ataca o grupo carboxila ativado do aminoácido 2 para formar uma ligação peptídica.
Dicicloexiluréia (produto colateral)
Reações ② a ④ repetidas tantas vezes quanto forem necessárias
HF
⑤ O peptídeo final é desprotegido como na reação ②; HF cliva a ligação éster entre o peptídeo e a resina
R¹
R²
H₃N⁺
F—CH₂

Figuras 5-29 – A síntese química de um peptídeo em um suporte de polímero insolúvel. As reações ① a ④ são necessárias para a formação de cada ligação peptídica. O grupo 9-fluorenil-metoxicarbonil (Fmoc, sombreado em azul) impede as reações indesejadas no grupo α-amino do resíduo (sombreado em vermelho). A síntese química ocorre a partir da extremidade carboxiterminal em direção à extremidade aminoterminal, o sentido inverso da direção da síntese protéica *in vivo* (Capítulo 27).

Resumo

Os 20 aminoácidos comumente encontrados como produto da hidrólise de proteínas contêm um grupo α-carboxila, um grupo α-amino e um grupo R característico, substituído no átomo de carbono α. O átomo de carbono α dos aminoácidos (exceto a glicina) é assimétrico; assim, o aminoácido pode existir em pelo menos duas formas estereoisoméricas. Apenas os L-estereoisômeros, os quais estão relacionados com a configuração absoluta do L-gliceraldeído, são encontrados em proteínas. Os aminoácidos são classificados com base na polaridade de seus grupos R. A classe alifática não-polar inclui alanina, glicina, isoleucina, leucina, prolina e valina. Fenilalanina, triptofano e tirosina têm cadeias laterais aromáticas e são, também, relativamente hidrofóbicas. A classe não-carregada, porém polar, inclui asparagina, cisteína, glutamina, metionina, serina e treonina. Os aminoácidos carregados negativamente (ácidos) são o aspartato e o glutamato, os carregados positivamente (básicos) são arginina, histidina e lisina. Existe também um grande número de aminoácidos não-primários que ocorrem em algumas proteínas (como resultado da modificação dos aminoácidos primários) ou como metabólitos livres no interior das células.

Os aminoácidos monoamino-monocarboxílicos são ácidos dipróticos ($^{+}H_3NCH(R)COOH$) quando em solução de pH baixo. À medida que o pH é elevado até próximo de 6, perto do ponto isoelétrico, o próton do grupo carboxila é perdido para formar a espécie dipolar ou "zwitterion" $^{+}H_3NCH(R)COO^-$, eletricamente neutra. Aumentos posteriores no pH provocam a perda do segundo próton, para liberar a espécie iônica $H_2NCH(R)COO^-$. Os aminoácidos com grupos R ionizáveis podem existir como espécies iônicas adicionais, dependendo do pH e do pK_a do grupo R. Assim, os aminoácidos têm propriedades acidobásicas muito variáveis.

Os aminoácidos podem ser unidos covalentemente por ligações peptídicas, para formar peptídeos e proteínas. As células geralmente contêm milhares de proteínas diferentes, cada uma com uma atividade ou função biológica distinta. As proteínas podem ser constituídas por cadeias muito longas, de 100 a milhares de resíduos de aminoácidos. No entanto, alguns peptídeos de ocorrência natural apresentam apenas alguns resíduos de aminoácidos. Algumas proteínas são compostas por várias cadeias polipeptídicas associadas não-covalentemente, denominadas subunidades. As proteínas simples produzem apenas aminoácidos, após serem submetidas a hidrólise; já, as proteínas conjugadas contêm, além de aminoácidos, algum outro componente, como um íon metálico ou um grupo prostético orgânico.

Há quatro níveis de estrutura protéica que podem ser geralmente reconhecidos. A estrutura primária refere-se à seqüência de aminoácidos e à localização das ligações dissulfeto. A estrutura secundária consiste na localização espacial dos aminoácidos adjacentes em extensões localizadas. A estrutura terciária é a conformação tridimensional de toda uma cadeia polipeptídica. A estrutura quaternária envolve a localização espacial de múltiplas cadeias polipeptídicas associadas de maneira estável.

As proteínas são purificadas em função das diversas propriedades nas quais podem diferir entre si. As proteínas podem ser seletivamente precipitadas pela adição de certos sais. Uma ampla quantidade de métodos cromatográficos utiliza as diferenças de tamanho, as propriedades de ligação, carga e outras. A eletroforese pode separar as proteínas com base em sua massa ou carga. Todos os procedimentos de purificação necessitam de um método para quantificar a proteína de interesse na presença de outras proteínas.

Diferenças na função das proteínas são resultantes de diferenças na composição de aminoácidos e em sua seqüência. As seqüências de aminoácidos são deduzidas a partir da fragmentação dos polipeptídeos em peptídeos menores, empregando-se reagentes conhecidos por clivarem ligações peptídicas específicas e, em seguida, determinando-se a seqüência de aminoácidos de cada fragmento pelo procedimento da degradação de Edman automatizada e ordenando-se os fragmentos peptídicos a partir das superposições de seqüência encontradas entre fragmentos gerados por reagentes distintos. Uma seqüência protéica também pode ser deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos de seu gene correspondente no DNA. A comparação de uma seqüência de proteínas com os milhares de seqüências conhecidas permite, com freqüência, prever diversas características da proteína em questão, como sua estrutura, função, localização celular e evolução.

Proteínas pequenas e peptídeos (de até 100 resíduos de comprimento) podem ser quimicamente sintetizados. O peptídeo é preparado pela adição de um resíduo de aminoácidos por ciclo, permanecendo retido a um suporte sólido durante o processo.

Leitura Adicional

Geral

Creighton TE. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma fonte geral muito útil.

Sanger F. (1988) Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 1-28.

Um excelente relato histórico sobre o desenvolvimento dos métodos de seqüenciamento.

Aminoácidos

Greenstein JP & **Winitz** M. (1961) *Chemistry of the Amino Acids*, 3 Vols, John Wiley & Sons, New York.

Kreil G. (1977) D-Amino acids in animal peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 337-345.

Uma atualização sobre a ocorrência desses estereoisômeros não habituais de aminoácidos.

Meister A. (1965) *Biochemistry of the Amino Acids,* 2nd edn, Vols 1 and 2, Academic Press, Inc., New York.

Um tratamento enciclopédico sobre as propriedades, a ocorrência e o metabolismo dos aminoácidos.

Peptídeos e proteínas

Doolittle RF. (1985) Proteins. *Sci. Am.* **253** (October), 88-99.

Uma visão geral que salienta os relacionamentos evolucionários.

Trabalhando com as proteínas

Dunn MJ. (1997) Quantitative two-dimensional gel electrophoresis: from proteins to proteomes. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 248-254.

Dunn MJ & Corbett JM. (1996) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **271**, 177-203.

Uma descrição detalhada da tecnologia.

Kornberg A. (1990) Why purify enzymes? *Methods Enzymol.* **182**, 1-5.

O papel fundamental dos métodos bioquímicos clássicos em uma nova era.

Scopes RK. (1994) *Protein Purification: Principles and Practice,* 3rd edn, Springer-Verlag, New York.

Uma boa fonte para se obter descrições completas dos princípios nos quais se baseiam a cromatografia e outros métodos.

A estrutura covalente das proteínas

Andersen JS, Svensson B & Roepstorff P. (1996) Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 449-457.

Um resumo que enfatiza as aplicações.

Bork P & Koonin EV. (1998) Predicting functions from protein sequences – where are the bottlenecks? *Nat. Genet.* **18**, 313-318.

Uma boa descrição sobre a tecnologia e os empecilhos que ainda limitam o seu uso.

Dongre AR, Eng JK, & Yates JR III. (1997) Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *Trends Biotechnol.* **15**, 418-425.

Uma descrição detalhada dos métodos.

Gibney BR, Rabanal F, & Dutton PL. (1997) Synthesis of novel proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 537-542.

Koonin EV, Tatusov RL, & Galperin MY. (1998) Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 355-363.

Uma boa discussão sobre o que iremos fazer com a quantidade imensa de informação sobre seqüências protéicas que vem se tornando disponível.

Mann M & Wilm M. (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 219-224.

Um resumo adequado para iniciantes.

Wallace CJ. (1995) Peptide ligation and semisynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 403-410.

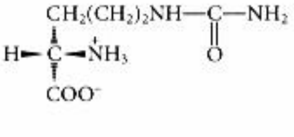
Um bom resumo dos métodos disponíveis para a ligação de peptídeos. Inclui alguns estudos de casos específicos.

Wilken J & Kent SB. (1998) Chemical protein synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 412-426.

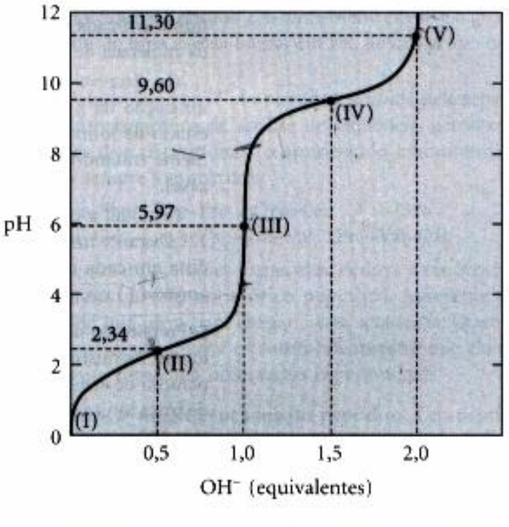
Uma boa visão geral sobre a síntese química, focalizando principalmente os métodos de ligação de peptídeos e suas aplicações.

Problemas

1. Configuração absoluta da citrulina. A citrulina (fórmula química mostrada a seguir) isolada da melancia é um aminoácido da forma D ou L? Explique.



2. Relação entre a curva de titulação e as propriedades acidobásicas da glicina. Um volume de 100mL de solução de glicina 0,1M com pH 1,72 foi titulado com solução de NaOH 2,0M. Durante a titulação, o pH foi acompanhado e os resultados lançados no gráfico ao lado. Os pontos-chave da titulação foram marcados de I a V no gráfico. Para cada uma das afirmativas de (a) a (o) a seguir, *identifique* o ponto-chave na titulação e *justifique* sua escolha.



(a) Em qual ponto a glicina estará presente predominantemente como a espécie $^{+}H_3N—CH_2—COOH$?

(b) Em qual ponto a carga *média* líquida da glicina é $+\frac{1}{2}$?

(c) Em qual ponto o grupo amino de metade das moléculas da glicina está no estado ionizado?

(d) Em qual ponto o pH tem valor igual ao pK_a de ionização do grupo carboxila da glicina?

(e) Em qual ponto o pH tem valor igual ao pK_a de ionização do grupo amino protonado?

(f) Em qual ponto a glicina tem capacidade máxima de tamponamento?

(g) Em qual ponto a carga líquida *média* da glicina é igual a zero?

(h) Em qual ponto o grupo carboxila da glicina está completamente titulado (primeiro ponto de equivalência)?

(i) Em qual ponto a glicina está completamente titulada (segundo ponto de equivalência)?

(j) Em qual ponto a forma predominante é $^{+}H_3N—CH_2—COO^{-}$?

(k) Em qual ponto a carga líquida média da glicina é igual a –1?

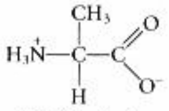
(l) Em qual ponto as estruturas das formas predominantes correspondem a uma mistura meio a meio de $^{+}H_3N—CH_2—COOH$ e $^{+}H_3N—CH_2—COO^{-}$?

(m) Em qual ponto se localiza o ponto isoelétrico?

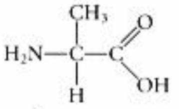
(n) Qual é o ponto final da titulação?

(o) Se se deseja usar a glicina como um tampão eficiente, quais pontos representam os *piores* valores de pH para a capacidade tamponante?

3. Que fração da alanina está presente nas formas completamente não-carregadas? Em pH igual ao ponto isoelétrico, a carga líquida da alanina é zero. Entretanto, embora a forma predominante da alanina no ponto isoelétrico (pI) seja a dipolar ("zwitterion"), duas estruturas da alanina têm carga líquida igual a zero (a forma "zwitterion" ou dipolar e a forma não-carregada).



"Zwitterion"



Sem carga

(a) Explique por que no seu ponto isoelétrico (pI) a forma da glicina é a forma "zwitterion", e não a completamente não-carregada.

(b) Calcule a fração da alanina presente em seu ponto isoelétrico (pI) como a forma completamente não-carregada. Justifique suas suposições.

4. Estado de ionização dos aminoácidos. Cada grupo ionizável de um aminoácido pode existir em uma de duas formas: carregada ou neutra. A carga elétrica do grupo funcional é determinada pela relação de seu pK_a com o pH da solução. Essa relação é descrita pela equação de Henderson-Hasselbalch.

(a) A histidina tem três grupos funcionais ionizáveis. Escreva as equações de equilíbrio relevantes para as suas três ionizações e indique a constante de equilíbrio (pK_a) apropriada para cada ionização. Escreva a estrutura da histidina em cada estado de ionização. Qual a carga líquida da molécula de histidina em cada estado de ionização?

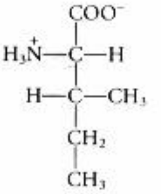
(b) Escreva as estruturas dominantes dos estados de ionização da histidina em pH 1, 4, 8 e 12. Note que o estado de ionização pode ser determinado aproximadamente tratando-se independentemente cada grupo ionizável.

(c) Qual a carga líquida da histidina em pH 1, 4, 8 e 12? Durante uma eletroforese, para onde migrará a histidina em cada um dos valores de pH indicados, para o ânodo (+) ou para o cátodo (–)?

5. Preparação de aminoácidos por cromatografia de troca iônica. As misturas de aminoácidos são analisadas pela separação de seus componentes por meio da cromatografia de troca iônica. Em uma resina de troca catiônica que contém grupos sulfonato (veja Fig. 5-18), os aminoácidos fluem ao longo da coluna em velocidades diferentes devido a dois fatores que retardam seu movimento: (1) atrações iônicas entre os resíduos $—SO_3^{-}$ na coluna e os grupos funcionais carregados positivamente nos aminoácidos e (2) interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais dos aminoácidos e o esqueleto fortemente hidrofóbico da resina. Para cada par dos aminoácidos listados a seguir, determine qual membro será eluído primeiro de uma coluna de resina de troca iônica por um tampão de pH 7.

(a) Asp e Lys
(b) Arg e Met
(c) Glu e Val
(d) Gly e Leu
(e) Ser e Ala

6. Denominação dos estereoisômeros da isoleucina. A estrutura do aminoácido isoleucina é:



(a) Quantos centros quirais ela tem?

(b) Quantos isômeros ópticos?

(c) Escreva as fórmulas em perspectiva para todos os isômeros ópticos da isoleucina.

7. Comparação entre os valores de pK_a da alanina e da polialanina. A curva de titulação da alanina mostra a ionização de dois grupos funcionais com valores de pK_a 2,34 e 9,69, correspondendo à ionização do grupo carboxila e à protonação dos grupos amino, respectivamente. A titulação de di, tri e oligopeptídeos de alanina mostra também a ionização de apenas dois grupos funcionais, embora o valor experimental dos pK_a respectivos seja diferente. A tendência dos valores de pK_a está resumida na tabela a seguir:

Aminoácido ou peptídeo	pK_1	pK_2
Ala	2,34	9,69
Ala–Ala	3,12	8,30
Ala–Ala–Ala	3,39	8,03
Ala–(Ala)$_n$–Ala, $n \geq 4$	3,42	7,94

(a) Desenhe a estrutura de Ala–Ala–Ala. Identifique os grupos funcionais associados a pK_1 e pK_2.

(b) O valor de pK_1 *aumenta* quando se vai de Ala para um oligopeptídeo composto somente de Ala. Forneça uma explicação para essa tendência.

(c) O valor de pK_2 *diminui* quando se vai de Ala para um oligopeptídeo de Ala. Forneça uma explicação para essa tendência.

8. O tamanho das proteínas. Qual é o peso molecular aproximado de uma proteína com 682 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica?

9. O número de resíduos de triptofano na soroalbumina bovina. Uma análise quantitativa de aminoácidos revela que a soroalbumina bovina (BSA) contém 0,58% de triptofano (M_r 204) por peso.

(a) Calcule o peso molecular mínimo da BSA (isto é, considerando que há apenas um único resíduo de triptofano por molécula protéica).

(b) A filtração em gel da BSA fornece um peso molecular estimado de 70.000. Quantos resíduos de triptofano estão presentes na molécula de soroalbumina?

10. Carga elétrica líquida de peptídeos. Um peptídeo apresenta a seqüência

Glu – His – Trp – Ser – Gly – Leu – Arg – Pro – Gly

(a) Qual é a carga líquida da molécula em pH 3, 8 e 11? (Utilize os valores de pK_a para as cadeias laterais e grupos amino e carboxiterminais dados na Tabela 5-1.)

(b) Estime o pI para esse peptídeo.

11. Ponto isoelétrico da pepsina. Pepsina é o nome dado a diversas enzimas digestivas que são secretadas (como proteínas precursoras de maior tamanho) por glândulas localizadas no interior do estômago. Essas glândulas também secretam ácido clorídrico, que dissolve as partículas de alimentos, permitindo a clivagem pela pepsina das moléculas protéicas individuais. A mistura resultante de comida, HCl e enzimas digestivas é conhecida por quimo e possui um pH próximo de 1,5. Qual é o pI que você esperaria encontrar para a pepsina? Que grupos funcionais devem estar presentes para conferir esse pI à pepsina? Quais aminoácidos protéicos poderiam contribuir com esses grupos?

12. O ponto isoelétrico das histonas. As histonas são proteínas encontradas no núcleo das células eucarióticas associadas fortemente ao DNA, que possui muitos grupos fosfato. O pI das histonas é bem elevado, cerca de 10,8. Quais resíduos de aminoácidos devem estar presentes em números relativamente elevados nas histonas? De que modo esses resíduos contribuem para a forte ligação das histonas ao DNA?

13. Solubilidade dos polipeptídeos. Um método para separar os polipeptídeos faz uso de suas diferenças em solubilidade. A solubilidade dos grandes polipeptídeos em água depende da polaridade relativa dos seus grupos R, particularmente do número de grupos ionizados: quanto maior for o número de grupos ionizados, mais solúvel será o polipeptídeo. Qual dos seguintes pares de polipeptídeos é mais solúvel no pH indicado?

(a) $(Gly)_{20}$ ou $(Glu)_{20}$ em pH 7

(b) $(Lys–Ala)_3$ ou $(Phe–Met)_3$ em pH 7

(c) $(Ala–Ser–Gly)_5$ ou $(Asn–Ser–His)_5$ em pH 6

(d) $(Ala–Asp–Gly)_5$ ou $(Asn–Ser–His)_5$ em pH 3

14. Purificação de uma enzima. Um bioquímico descobre e purifica uma nova enzima, produzindo a seguinte tabela de purificação:

Procedimento	Proteína total (mg)	Atividade (unidades)
1. Extrato total	20.000	4.000.000
2. Precipitação (sal)	5.000	3.000.000
3. Precipitação (pH)	4.000	1.000.000
4. Cromatografia de troca iônica	200	800.000
5. Cromatografia de afinidade	50	750.000
6. Cromatografia de exclusão	45	675.000

(a) A partir da informação fornecida por esta tabela, calcule a atividade específica da solução enzimática após cada procedimento de purificação.

(b) Qual dos procedimentos de purificação usados para essa enzima é o mais eficiente (isto é, fornece o maior aumento relativo no grau de pureza)?

(c) Qual dos procedimentos de purificação é o menos eficiente?

(d) Existe algum indicativo nos resultados mostrados de que a enzima estaria pura após a etapa 6? O que mais poderia ser feito para estimar o grau de pureza da preparação enzimática?

15. Determinação da seqüência do peptídeo cerebral leucina encefalina. Um grupo de peptídeos que influencia a transmissão nervosa em certas partes do cérebro foi isolado de tecido cerebral normal. Esses peptídeos são conhecidos como opióides, por se ligarem a receptores específicos aos quais também se ligam drogas opiáceas como a morfina e o naloxone. Dessa maneira, os opióides mimetizam algumas propriedades dos opiáceos. Alguns pesquisadores consideram esses peptídeos como sendo analgésicos endógenos do cérebro. Usando as informações descritas a seguir, determine a seqüência de aminoácidos do opióide leucina encefalina. Explique como a sua estrutura é consistente com cada trecho da informação.

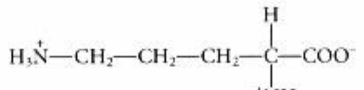
(a) A hidrólise completa por HCl 6M a 110°C, seguida por uma análise completa de aminoácidos, indicou a presença de Gly, Leu, Phe e Tyr em uma razão molar de 2:1:1:1.

(b) O tratamento do peptídeo com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno, seguido pela hidrólise completa de cromatografia, indicou a presença do derivado 2,4-dinitrofenil da tirosina. Não foi encontrada tirosina livre.

(c) A digestão completa do peptídeo com pepsina, seguida por cromatografia, forneceu um dipeptídeo que contém Phe e Leu mais um tripeptídeo que contém Tyr e Gly em uma razão de 1:2.

16. Estrutura de um antibiótico de *Bacillus brevis*. Extratos da bactéria *Bacillus brevis* contêm um peptídeo com propriedades antibióticas. Esse peptídeo forma complexos com íons metálicos e aparentemente interrompe o transporte iônico através das membranas celulares de outras espécies bacterianas, matando-as. A estrutura do peptídeo foi determinada a partir das seguintes observações:

(a) A hidrólise ácida completa do peptídeo, seguida por análise de aminoácidos, forneceu quantidades equimolares de Leu, Orn, Phe, Pro e Val. Orn é a ornitina, um aminoácido não presente em proteínas, mas presente em alguns peptídeos. Apresenta a estrutura

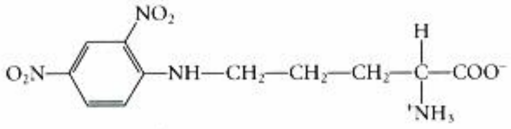


$$H_3\overset{+}{N}—CH_2—CH_2—CH_2—\underset{{}^{+}NH_3}{\overset{H}{C}}—COO^-$$

(b) O peso molecular do peptídeo foi estimado como sendo de cerca de 1.200.

(c) O peptídeo não sofreu hidrólise ao ser tratado com a enzima carboxipeptidase. Essa enzima catalisa a hidrólise do resíduo carboxiterminal de um polipeptídeo, exceto se este for Pro ou não contiver um grupo carboxila livre por alguma razão.

(d) O tratamento do peptídeo intacto com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno, seguido pela hidrólise completa e cromatografia, gerou apenas aminoácidos livres e o seguinte derivado:



(Dica: note que o derivado 2,4-dinitrofenil envolve o grupo amino de uma cadeia lateral em vez de um grupo α-amino.)

(e) A hidrólise parcial do peptídeo, seguida pela separação cromatográfica de análise de seqüência, gerou os seguintes di e tripeptídeos (o aminoácido aminoterminal está sempre à esquerda):

Leu–Phe Phe–Pro Orn–Leu Val–Orn
Val–Orn–Leu Phe–Pro–Val Pro–Val–Orn

A partir das informações fornecidas, deduza a seqüência de aminoácidos do antibiótico peptídico. Apresente o raciocínio que usou para chegar a essa seqüência. Quando tiver chegado a uma estrutura, demonstre que ela é consistente com cada observação experimental.

17. Eficiência no seqüenciamento peptídico. Um peptídeo com a estrutura primária Lys–Arg–Pro–Leu–Ile–Asp–Gly–Ala é seqüenciado pelo procedimento de Edman. Se cada ciclo de Edman tiver uma eficiência de 96%, que porcentagem de aminoácidos liberados no quarto ciclo corresponderia à leucina? Execute novamente o cálculo, assumindo uma eficiência de 99% para cada ciclo.

18. Protocolos de bioquímica: sua primeira purificação protéica. Como estudante mais recente e menos experiente em um laboratório de pesquisas bioquímicas, suas primeiras semanas consistirão em lavar vidrarias e marcar tubos de ensaio. Em seguida, você se qualifica para preparar soluções-tampão e estoques para o uso em diversos procedimentos laboratoriais. Finalmente, lhe é dada a responsabilidade de purificar uma proteína. É uma enzima do ciclo do ácido cítrico, a citrato sintase, localizada na matriz mitocondrial. Seguindo um protocolo para a purificação, você executa as etapas descritas a seguir. À medida que executa o trabalho, um estudante mais experiente o questiona sobre as razões da execução de cada procedimento. Forneça as respostas. (Dica: veja o Capítulo 2 para informações sobre separação de organelas celulares e o Capítulo 4 para informações sobre osmolaridade.)

(a) Você traz 20kg de coração bovino de um matadouro próximo. Você os transporta sob gelo e executa cada etapa da purificação em uma câmara fria ou sob gelo. Você homogeneiza o tecido cardíaco, utilizando um homogeneizador de alta velocidade em um meio que contém sacarose ~0,2M, tamponada em um pH de 7,2. *Por que você usa tecido cardíaco bovino e nessa grande quantidade? Qual é o propósito de manter o tecido frio e suspendê-lo em sacarose 0,2M, em pH 7,2? O que ocorre com o tecido quando é homogeneizado?*

(b) Você submete o homogenado de tecido cardíaco resultante, que é denso e opaco, a uma série de etapas de centrifugação diferencial. *O que se consegue com isso?*

(c) Você continua com a purificação usando a fração sobrenadante que contém principalmente mitocôndrias intactas. Em seguida, você faz uma lise osmótica das mitocôndrias. O lisado, que é menos denso que o homogenado, mas ainda opaco, consiste principalmente de membranas mitocondriais e conteúdo mitocondrial interno. A esse lisado, você adiciona sulfato de amônio, um sal altamente solúvel, até uma concentração específica. Você centrifuga a solução, decanta o sobrenadante e descarta o precipitado. Ao sobrenadante, que é mais claro que o lisado, você adiciona mais sulfato de amônio. Uma vez mais você centrifuga a amostra, mas dessa vez você retém o precipitado, pois este contém a proteína de interesse. *Qual a razão para se adicionar o sal em duas etapas?*

(d) Você solubiliza o precipitado de sulfato de amônio que contém as proteínas mitocondriais e o dialisa contra grandes volumes de uma solução tamponada (pH 7,2). *Por que o sulfato de amônio não é incluído no tampão de diálise? Por que você utiliza uma solução tamponada em vez de água?*

(e) Você aplica a solução dialisada em uma coluna de cromatografia por exclusão. Seguindo o protocolo, você coleta a primeira fração protéica que sai da coluna e descarta as frações restantes que são eluídas posteriormente. Você detecta a proteína por medidas da absorção no ultravioleta (UV, em 280nm) das frações. *O que a instrução de coletar a primeira fração nos diz sobre a proteína? Por que a absorção no UV em 280nm é uma boa maneira de se monitorar a presença de proteína nas frações eluídas?*

(f) Você aplica a fração coletada em (e) em uma coluna cromatográfica de troca catiônica. Após desprezar a solução inicial que deixa a coluna, você adiciona uma solução de lavagem de pH mais alto à coluna e colhe a fração protéica que é imediatamente eluída. *Explique o que está fazendo.*

(g) Você aplica uma pequena quantidade de sua fração, agora bem reduzida em volume e completamente transparente (embora apresentando uma coloração rosada), em um gel de focalização isoelétrica. Quando corado, o gel mostra três bandas bem definidas. De acordo com o protocolo, a proteína de interesse é a que apresenta um pI de 5,6, mas você decide fazer mais um teste de pureza protéica. Você corta a banda de pI 5,6 e a submete a uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. A proteína aparece como uma única banda. *Por que você não estava convencido(a) da pureza da "única" banda protéica no seu gel de focalização isoelétrica? O que os resultados do gel com SDS mostraram a você? Por que é importante executar a eletroforese em gel com SDS após a focalização isoelétrica?*

CAPÍTULO 6

Estrutura Tridimensional das Proteínas

O esqueleto covalente de uma proteína típica contém centenas de ligações individuais. Sendo possível a rotação livre em torno de muitas dessas ligações, a proteína pode assumir um número ilimitado de conformações. Entretanto, o fato de cada proteína ter uma função química ou estrutural específica sugere fortemente que cada uma tenha uma estrutura tridimensional singular (Fig. 6-1). No fim dos anos 1920, várias proteínas haviam sido cristalizadas, inclusive a hemoglobina (M_r 64.500) e a enzima urease (M_r 483.000). Considerando que a disposição ordenada das moléculas em um cristal geralmente pode formar-se somente quando as unidades moleculares são idênticas, o simples fato de muitas proteínas poderem ser cristalizadas constitui uma forte evidência de que até mesmo proteínas muito grandes são entidades químicas distintas com estruturas singulares. Essa conclusão revolucionou o que se pensava sobre as proteínas e suas funções.

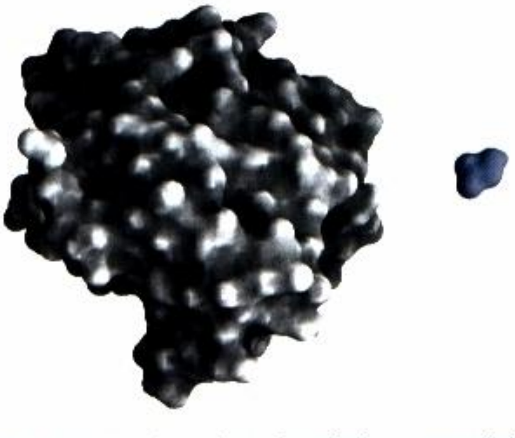


Figura 6-1 – Estrutura da enzima quimotripsina, uma proteína globular. As proteínas são moléculas grandes e, como veremos, cada uma possui uma estrutura única. Uma molécula de glicina (azul) é mostrada para a comparação de tamanho.

Neste capítulo, explicaremos a estrutura tridimensional das proteínas, dando ênfase a cinco temas. Primeiro, a estrutura tridimensional de uma proteína é determinada por sua seqüência de aminoácidos. Segundo, a função de uma proteína depende de sua estrutura. Terceiro, uma proteína isolada tem uma estrutura singular ou quase singular. Quarto, as interações covalentes são as forças mais importantes que estabilizam a estrutura específica mantida por uma dada proteína. Finalmente, entre o número imenso de estruturas de proteínas singulares, podemos reconhecer alguns padrões estruturais comuns que nos ajudam a organizar nossa compreensão da arquitetura protéica.

Esses temas não dão a entender que as proteínas possuem estruturas tridimensionais estáticas, invariáveis. Com freqüência, a função da proteína implica em uma interconversão entre duas ou mais formas estruturais. Os aspectos dinâmicos da estrutura das proteínas serão explorados em capítulos posteriores.

A relação entre a seqüência de aminoácidos de uma proteína e sua estrutura tridimensional é um quebra-cabeça intricado, que está sendo gradualmente resolvido com as técnicas usadas pela bioquímica moderna. A compreensão da estrutura é, por sua vez, essencial para a discussão da função apresentada nos capítulos seguintes. Podemos descobrir e compreender os padrões dentro do labirinto bioquímico da estrutura protéica, aplicando os princípios fundamentais da bioquímica e da física.

Aspectos Gerais da Estrutura Protéica

Conformação é a denominação dada ao arranjo espacial dos átomos de uma proteína. As possíveis conformações de uma proteína incluem qualquer estado estrutural que possa ser atingido sem romper as ligações covalentes. Por exemplo, pode ocorrer uma mudança na conformação pela rotação em torno de ligações simples. Entre as numerosas conformações possíveis, teoricamente, em uma proteína que contenha centenas de ligações simples, normalmente predominam uma ou algumas em condições biológicas. Geralmente, a conformação existente sob um determinado conjunto de condições é a termodinamicamente mais estável, tendo a menor energia livre de Gibbs (G). As proteínas em qualquer de suas conformações enoveladas funcionais são denominadas **proteínas nativas**.

Quais são os princípios que determinam a conformação mais estável de uma proteína? É possível elaborar uma compreensão da conformação protéica, passo a passo, partindo da discussão sobre a estrutura primária apresentada no Capítulo 5 e passando pela consideração sobre as estruturas secundária, terciária e quaternária. A essa abordagem tradicional deve-se acrescentar uma nova ênfase sobre as estruturas supersecundárias, um crescente conjunto de padrões de enovelamentos protéicos, passíveis de serem classificados, que fornecem um importante contexto organizacional a esse empreendimento complexo. Iniciamos introduzindo alguns princípios orientadores.

A conformação de uma proteína é estabilizada em grande parte por interações fracas

No contexto da estrutura protéica, o termo **estabilidade** pode ser definido como sendo a tendência à manutenção de uma conformação nativa. As proteínas nativas são apenas ligeiramente estáveis; o ΔG que separa os estados enovelado e desenovelado em proteínas típicas sob condições fisiológicas se situa na faixa de apenas 20 a 65kJ/mol. Uma dada cadeia polipeptídica pode assumir, teoricamente, incontáveis conformações distintas, e, como resultado disso, o estado desenovelado de uma proteína é caracterizado por um elevado grau de entropia conformacional. Essa entropia e as interações por meio de ligações de hidrogênio entre os diversos grupos da cadeia polipeptídica e o solvente (água) tendem a manter o estado desenovelado. As interações químicas que se contrapõem a esses efeitos e estabilizam a conformação nativa incluem as ligações dissulfeto e as interações fracas (não-covalentes) descritas no Capítulo 4: as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas e iônicas. Uma apreciação do papel dessas interações fracas é especialmente importante para o nosso entendimento de como as cadeias polipeptídicas dobram-se em estruturas secundárias e terciárias específicas, e combinam-se com outras proteínas para formar estruturas quaternárias.

Cerca de 200 a 460kJ/mol são necessários para romper uma ligação covalente simples, enquanto, para as interações fracas, esse valor cai para uma faixa entre 4 e 30kJ/mol. As ligações covalentes individuais que contribuem para as conformações nativas das proteínas, como as ligações dissulfeto que unem partes separadas de uma única cadeia polipeptídica, são claramente muito mais fortes do que as interações fracas individuais; entretanto, as interações fracas são a força predominante para a manutenção da estrutura protéica, devido ao fato de serem muito numerosas. Em geral, a conformação protéica com a menor energia livre (isto é, a conformação mais estável) é a que possui o número máximo de interações fracas.

A estabilidade de uma proteína não é simplesmente a soma das energias livres de formação das diversas interações fracas nela presentes. Cada grupo capaz de formar ligações de hidrogênio presente em uma cadeia polipeptídica enovelada encontrava-se ligado à água por ligações de hidrogênio antes do enovelamento, de modo que, para cada ligação de hidrogênio formada em uma proteína, uma ligação de hidrogênio (energeticamente semelhante) entre esse grupo e a água deve ser rompida. A estabilidade líquida fornecida por uma interação fraca, ou a *diferença* entre as energias livres dos estados enovelado e desenovelado, pode ser próxima de zero. Devemos, portanto, procurar por outras explicações para o fato de existir um favorecimento da conformação nativa de uma proteína.

A contribuição das interações fracas para a estabilidade das proteínas pode ser entendida em termos das propriedades da água (Capítulo 4). A água pura contém uma rede de moléculas de H_2O unidas por ligações de hidrogênio. Nenhuma outra molécula possui o potencial de estabelecer ligações de hidrogênio como a molécula de água, e as outras moléculas presentes em uma solução aquosa rompem essas ligações. Quando a água envolve uma molécula hidrofóbica, a disposição ótima das ligações de hidrogênio resulta em um envoltório altamente estruturado ou **camada de solvatação** da água na vizinhança imediata. A ordenação aumentada das moléculas de água na camada de solvatação correlaciona-se com uma redução desfavorável na entropia da água. Entretanto, quando grupos não-polares são reunidos, há uma redução na extensão da camada de solvatação, uma vez que cada grupo não mais apresenta sua superfície total à solução. O resultado é um aumento favorável na entropia. Conforme descrito no Capítulo 4, essa entropia é a principal força termodinamicamente atuante no sentido da associação de grupos hidrofóbicos em solução aquosa. As cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos tendem, portanto, a se reunir em um ambiente interno da proteína, afastadas da água.

Sob condições fisiológicas, a formação de ligações de hidrogênio e as interações iônicas em uma proteína são em grande parte orientadas por esse mesmo efeito entrópico. Os grupos polares podem, em geral, formar ligações de hidrogênio com a água, sendo assim nela solúveis. No entanto, o número de ligações de hidrogênio por unidade de massa é geralmente maior para a água pura do que para qualquer outro líquido ou solução, e há limites à solubilidade até mesmo das moléculas mais polares, já que a sua presença causa uma diminuição no número de ligações de hidrogênio por unidade de massa. Assim, haverá uma certa formação de camada de solvatação de moléculas estruturadas de água até mesmo em torno de moléculas polares. Embora a energia de formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular ou a interação iônica entre dois grupos polares em uma macromolécula sejam bastante contrabalançadas pela eliminação das interações entre esses grupos e a água, a liberação das moléculas estruturadas de água, quando a interação intramolecular é formada, fornece a força motora entrópica para o enovelamento. A maior parte da alteração de energia livre que ocorre quando interações fracas se formam no interior de uma proteína é, portanto, derivada do aumento na entropia na solução aquosa circundante como resultado do encobrimento das superfícies hidrofóbicas. Isso mais do que contrabalança a grande perda de entropia conformacional que se verifica quando um polipeptídeo é submetido a uma única conformação enovelada.

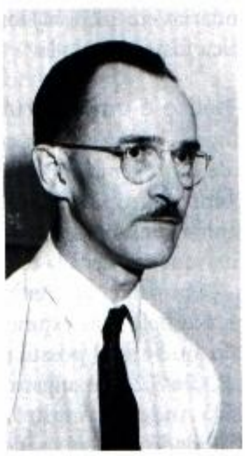
As interações hidrofóbicas são claramente importantes para a estabilização de uma conformação protéica; o interior de uma proteína é geralmente constituído por um núcleo densamente empacotado de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Também é importante que quaisquer grupos polares ou carregados que estejam presentes no interior da proteína possuam pares adequados para estabelecer ligações de hidrogênio ou interações iônicas. Uma ligação de hidrogênio parece contribuir pouco para a estabilidade de uma estrutura nativa, mas a presença de grupos carregados ou capazes de efetuar ligações de hidrogênio, sem os respectivos pares no núcleo hidrofóbico de uma proteína, pode ser tão *desestabilizante* que conformações com tais grupos são, com freqüência, impossibilitadas termodinamicamente. A alteração favorável na energia livre que se verifica ao se combinar um desses grupos com um parceiro presente na solução circundante pode ser maior do que a diferença na energia livre entre os estados enovelado e desenovelado. Além disso, as ligações de hidrogênio que ocorrem entre os grupos, nas proteínas, se formam de modo cooperativo. A formação de uma ligação de hidrogênio facilita a formação de ligações de hidrogênio adicionais. A contribuição total das ligações de hidrogênio e de outras interações não-covalentes para a estabilização da conformação protéica ainda está sendo avaliada. A interação de grupos com carga oposta que formam um par iônico (ponte salina) pode ter também um efeito estabilizante em uma ou mais conformações nativas de algumas proteínas.

A maioria dos padrões estruturais resumidos neste capítulo reflete duas regras simples: (1) os resíduos hidrofóbicos estão, em sua maioria, mantidos no interior da molécula protéica, afastados da água; e (2) o número de ligações de hidrogênio dentro da proteína é maximizado. As proteínas insolúveis e as proteínas de membranas (que examinaremos no Capítulo 12) seguem regras diferentes por causa de sua função em seu meio ambiente, mas as interações fracas são, mesmo aí, elementos estruturais críticos.

A ligação peptídica é rígida e plana

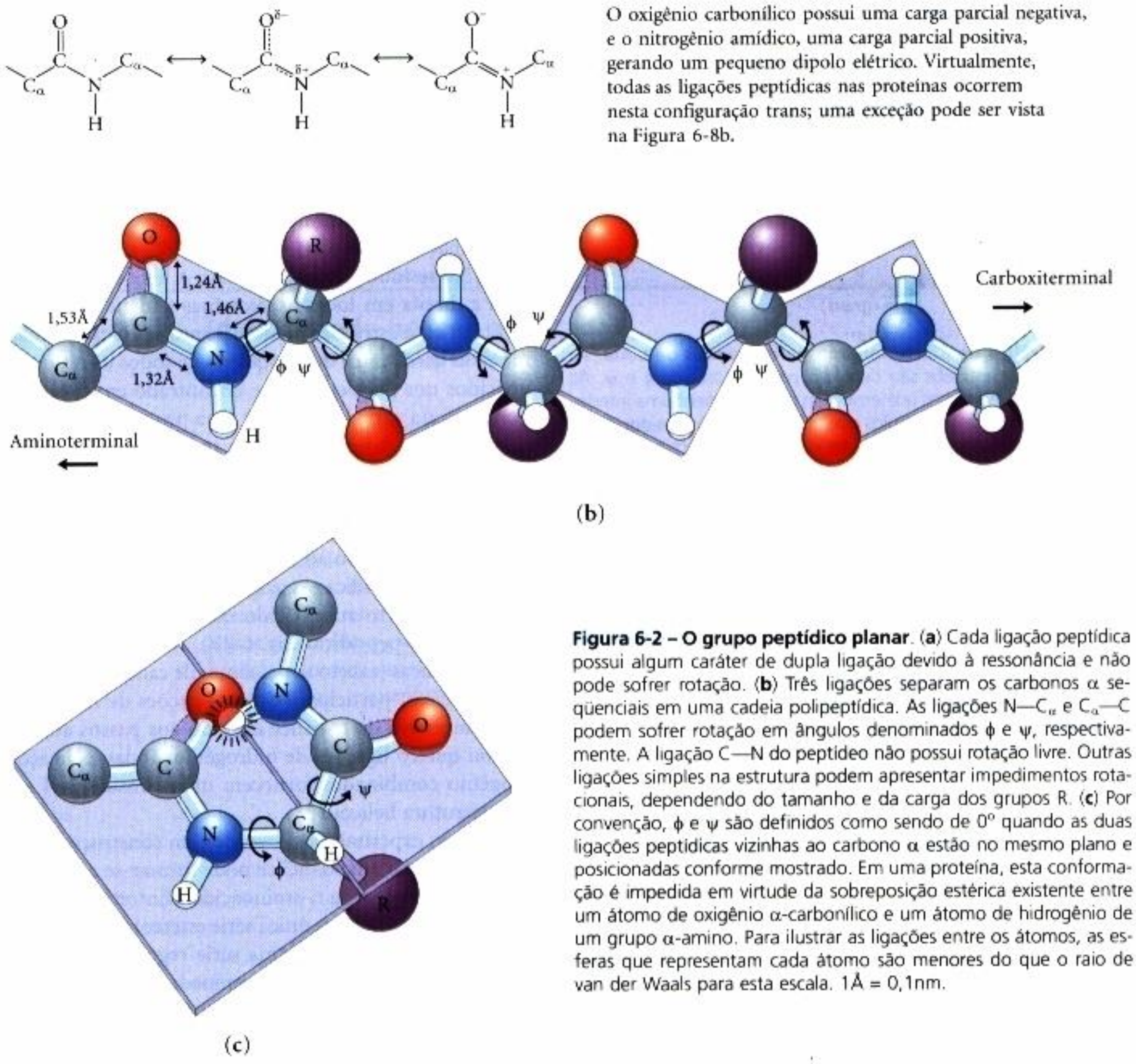
As ligações covalentes levam a importantes restrições à conformação de um polipeptídeo. No final da década de 1930, Linus Pauling e Robert Corey realizaram uma série de estudos que leva-

Linus Pauling
1901-1994



Robert Corey
1897-1971

ram aos fundamentos de nossa presente compreensão da estrutura das proteínas. Eles principiaram por uma análise cuidadosa da ligação peptídica. Os carbonos α dos resíduos de aminoácidos adjacentes estão separados por três ligações covalentes, em um arranjo que pode ser representado por C_α—C—N—C_α. Estudos de difração de raios X em cristais de aminoácidos e de dipeptídeos e tripeptídeos simples demonstraram que a ligação C—N em um peptídeo é um pouco mais curta que a ligação C—N em uma amina simples e os átomos associados com a ligação peptídica são coplanares. Isso indica uma ressonância ou compartilhamento parcial de dois pares de elétrons entre o oxigênio do grupo carbonila e o nitrogênio do grupo amida (Fig. 6-2a). O oxigênio possui uma carga parcial negativa, e o nitrogênio, uma carga parcial positiva, o que gera um pequeno dipolo elétrico. Os seis átomos do **grupo peptídico** situam-se em um mesmo plano, com o átomo de oxigênio do grupo carbonila e o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio do grupo amida em posição trans, um em relação ao outro. A partir dessas observações, Pauling e Corey concluíram que as ligações C—N em um peptídeo são incapazes de possuir rotação livre por causa de seu caráter parcial de dupla ligação. A rotação é permitida em torno das ligações N—C_α e C_α—C. A estrutura de uma cadeia



O oxigênio carbonílico possui uma carga parcial negativa, e o nitrogênio amídico, uma carga parcial positiva, gerando um pequeno dipolo elétrico. Virtualmente, todas as ligações peptídicas nas proteínas ocorrem nesta configuração trans; uma exceção pode ser vista na Figura 6-8b.

Figura 6-2 – O grupo peptídico planar. (**a**) Cada ligação peptídica possui algum caráter de dupla ligação devido à ressonância e não pode sofrer rotação. (**b**) Três ligações separam os carbonos α seqüenciais em uma cadeia polipeptídica. As ligações N—C_α e C_α—C podem sofrer rotação em ângulos denominados ϕ e ψ, respectivamente. A ligação C—N do peptídeo não possui rotação livre. Outras ligações simples na estrutura podem apresentar impedimentos rotacionais, dependendo do tamanho e da carga dos grupos R. (**c**) Por convenção, ϕ e ψ são definidos como sendo de 0° quando as duas ligações peptídicas vizinhas ao carbono α estão no mesmo plano e posicionadas conforme mostrado. Em uma proteína, esta conformação é impedida em virtude da sobreposição estérica existente entre um átomo de oxigênio α-carbonílico e um átomo de hidrogênio de um grupo α-amino. Para ilustrar as ligações entre os átomos, as esferas que representam cada átomo são menores do que o raio de van der Waals para esta escala. 1Å = 0,1nm.

polipeptídica pode ser assim representada por uma série de planos rígidos apresentando um ponto comum de rotação em C_α (Fig. 6-2b). As rígidas ligações peptídicas limitam a faixa de conformações que podem ser assumidas por uma cadeia polipeptídica.

Por convenção, os ângulos de ligação resultantes das rotações em C_α são denominados ϕ (fi) para a ligação N—C_α e ψ (psi) para a ligação C_α—C. Novamente por convenção, tanto ϕ como ψ são definidos como sendo iguais a 180° quando o polipeptídeo está em sua conformação totalmente estendida e todos os grupos peptídicos estão no mesmo plano (Fig. 6-2b). A princípio, ϕ e ψ podem ter qualquer valor entre –180° e +180°, mas muitos valores são inatingíveis por interferência estérica entre átomos na estrutura polipeptídica e cadeias laterais de aminoácidos. A conformação na qual tanto ϕ como ψ são iguais a 0° (Fig. 6-2c) é impedida por esse motivo, sendo utilizada meramente como ponto de referência para descrever os ângulos de rotação. Os valores possíveis para ϕ e ψ são revelados graficamente quando ψ é marcado em gráfico contra ϕ, em um **gráfico de Ramachandran** (Fig. 6-3), uma representação idealizada pela primeira vez por G.N. Ramachandran.

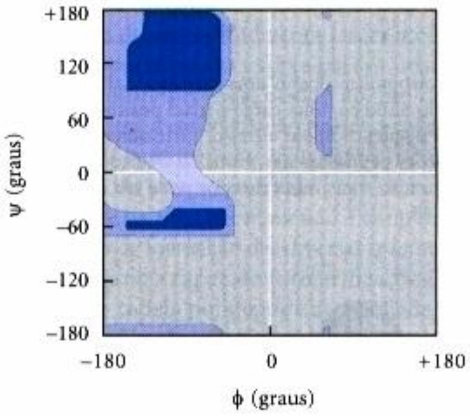


Figura 6-3 – Gráfico de Ramachandran para resíduos de L-Ala. As conformações dos peptídeos são definidas pelos valores de ϕ e ψ. As conformações possíveis são as que envolvem pouca ou nenhuma interferência estérica, com base em cálculos que utilizam raios de van der Waals e ângulos de ligações conhecidos. As áreas sombreadas em azul-escuro refletem conformações que não envolvem sobreposições estéricas, sendo assim totalmente permitidas; o azul-médio indica conformações permitidas nos limites extremos para os contatos atômicos desfavoráveis; a área azul-clara reflete conformações que são permitidas se houver uma pequena flexibilidade nos ângulos de ligação. A assimetria do gráfico é resultante da estereoquímica L dos resíduos de aminoácidos. Os gráficos de outros resíduos de L-aminoácidos com cadeias laterais não-ramificadas são quase idênticos. As faixas permitidas para os resíduos de aminoácidos de cadeias ramificadas como Val, Ile e Thr são um tanto quanto menores do que a para Ala. O resíduo Gly, que é bem menos impedido estericamente, exibe uma faixa muito maior de conformações permitidas. A faixa para os resíduos de Pro é bastante restrita, já que ϕ é limitado pela cadeia lateral cíclica à faixa de –35° a –85°.

A Estrutura Secundária das Proteínas

O termo **estrutura secundária** refere-se à conformação local de alguma porção de um polipeptídeo. A discussão sobre a estrutura secundária geralmente está centrada nos padrões regulares de enovelamento da estrutura polipeptídica. Alguns tipos de estrutura secundária são particularmente estáveis e freqüentemente encontrados nas proteínas. Os mais proeminentes são a α-hélice e as conformações β descritas a seguir. Empregando princípios químicos fundamentais e algumas observações experimentais, Pauling e Corey predisseram a existência dessas estruturas secundárias em 1951, vários anos antes que a primeira estrutura protéica fosse elucidada.

A α-hélice é uma estrutura secundária comum

Pauling e Corey estavam conscientes da importância das ligações de hidrogênio na orientação de grupos químicos polares, tais como os grupos C═O e N—H das ligações peptídicas. Eles dispunham também dos resultados experimentais de William Astbury que, na década de 1930, conduziu estudos pioneiros de raios X em proteínas. Astbury demonstrou que a proteína que forma o cabelo e os espinhos do porco-espinho (a proteína fibrosa α-queratina) possui uma estrutura regular que se repete a cada 5,15 a 5,2Å (o angstrom, Å, denominado em homenagem ao físico Anders J. Ångström, é igual a 0,1nm. Embora não seja uma unidade do SI, é usada universalmente por biólogos estruturais para descrever distâncias atômicas). Com essa informação e os seus dados relativos à ligação peptídica, e com a ajuda de modelos precisamente construídos, Pauling e Corey deduziram as conformações prováveis das moléculas protéicas.

O arranjo mais simples que uma cadeia polipeptídica pode assumir com suas ligações peptídicas rígidas (mas com as demais ligações simples livres para rotação) é uma estrutura helicoidal, a que Pauling e Corey denominaram de **α-hélice** (Fig. 6-4). Nessa estrutura, a cadeia polipeptídica é fortemente retorcida em torno de um eixo imaginário longitudinal que passa pelo centro da hélice, com os grupos R dos resíduos de aminoácidos projetando-se para a face externa da hélice. A unidade repetitiva é uma volta simples da hélice (passo), que se estende por 5,4Å ao longo do eixo, uma medida ligeiramente maior do que a que Astbury observou na queratina do cabelo por análise com raios X. Os resíduos de aminoácidos em uma α-hélice apresentam conformações com $\psi = -45°$ e $\phi = -60°$, e cada passo da hélice inclui 3,6 resíduos de aminoácidos. A hélice é sempre orientada para a direita em todas as proteínas (Adendo 6-1). A α-hélice mostrou ser a estrutura predominante nas α-queratinas. De forma mais geral, cerca de um quarto de todos os resíduos de aminoácidos nos polipeptídeos é encontrado em α-hélices; a proporção exata varia bastante de uma proteína para outra.

Por que a α-hélice se forma mais facilmente do que outras possíveis conformações? A resposta é, em parte, porque a α-hélice otimiza o uso das ligações de hidrogênio internas. A estrutura é estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio eletronegativo de uma ligação peptídica e o oxigênio eletronegativo do grupo carbonila do quarto aminoácido na extremidade aminoterminal dessa ligação peptídica (Fig. 6-4b). Na α-hélice, todas as ligações peptídicas (exceto as próximas de cada uma das extremidades da hélice) participam dessas ligações de hidrogênio. Cada passo sucessivo da α-hélice é unido aos passos adjacentes por três ou quatro ligações de hidrogênio. Todas as ligações de hidrogênio combinadas fornecem uma considerável estabilidade à estrutura helicoidal.

Outros experimentos baseados em construções de modelos mostraram que uma α-hélice pode formar-se em polipeptídeos que consistem de L ou D-aminoácidos. Entretanto, todos os resíduos devem ser de uma única série estereoisomérica; um D-aminoácido irá interromper uma série regular que consista de L-aminoácidos, e vice-versa. Os aminoácidos de ocorrência natural podem formar α-hélices orientadas tanto para a esquerda como para a direita; entretanto, α-hélices extensas orientadas para a esquerda não foram observadas em proteínas.

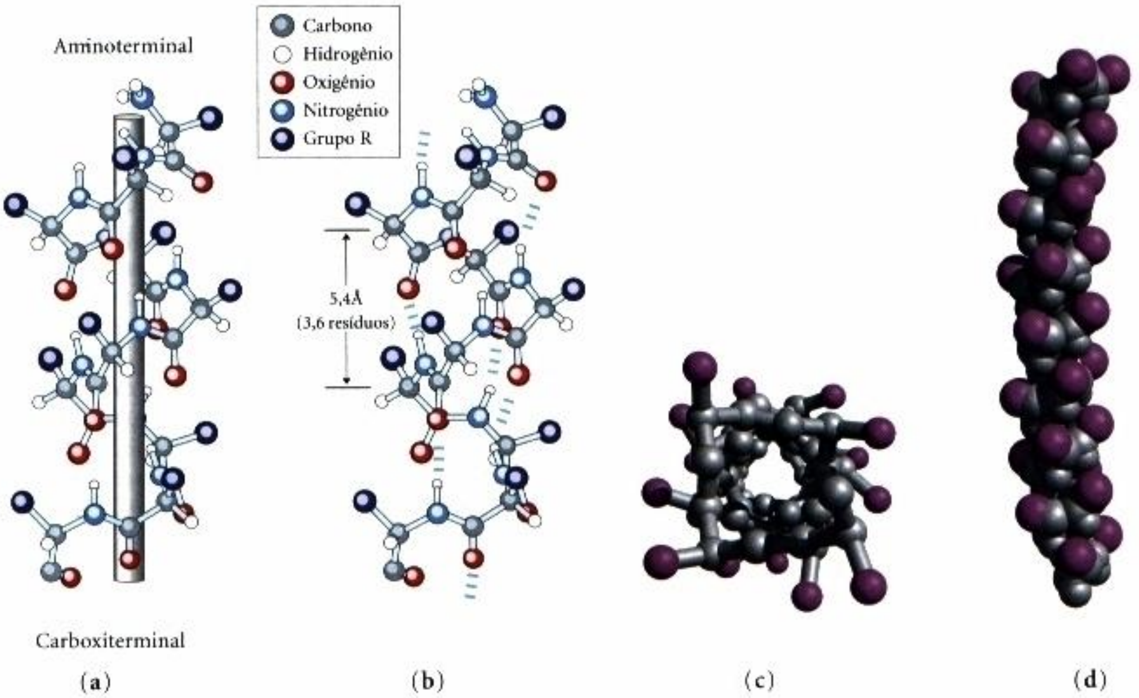
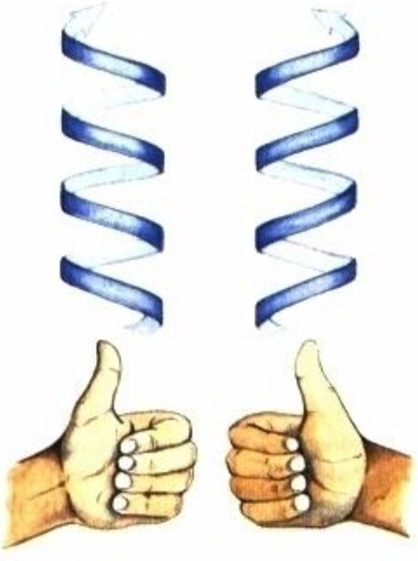


Figura 6-4 – Quatro modelos de α-hélice que mostram aspectos diferentes de sua estrutura. (**a**) Formação de uma α-hélice orientada para a direita. Os planos das ligações peptídicas rígidas são paralelos ao eixo da hélice, mostrado aqui como um bastão vertical. (**b**) Modelo bola-e-bastão de uma α-hélice orientada à direita, mostrando as ligações de hidrogênio intracadeia. A unidade repetitiva é um único passo da hélice, 3,6 resíduos. (**c**) A α-hélice vista a partir da extremidade superior. Observe as posições dos grupos R, representados por esferas lilás. Este modelo bola-e-bastão, utilizado para enfatizar o arranjo helicoidal, fornece a falsa impressão de que a α-hélice apresenta espaços vazios em seu interior, uma vez que as bolas não representam os raios de van der Waals dos átomos individuais. Como mostra o modelo espaço-cheio (**d**), os átomos no centro da α-hélice estão bem próximos entre si.

Adendo 6-1 Identificando hélices orientadas à direita ou à esquerda

Há um método simples para determinar se uma estrutura helicoidal é orientada à direita ou à esquerda. Feche os dedos de suas mãos, exceto os polegares que deverão apontar para cima. A mão direita estará indicando uma hélice, com os dedos fechados mostrando uma rotação anti-horária no sentido do polegar direito (para cima). Essa hélice será orientada à direita. A mão esquerda mostra uma hélice orientada à esquerda, que gira no sentido horário, à medida que se dirige para cima, em direção ao polegar esquerdo.



A seqüência de aminoácidos afeta a estabilidade da α-hélice

Nem todos os polipeptídeos podem formar uma α-hélice estável. Interações entre cadeias laterais de aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar essa estrutura. Por exemplo, se uma cadeia polipeptídica possuir um grande bloco de resíduos Glu, esse segmento da cadeia não irá formar uma α-hélice em pH 7. Os grupos carboxila negativamente carregados dos resíduos Glu adjacentes irão repelir um ao outro tão fortemente que isso superará a influência estabilizadora das ligações de hidrogênio na α-hélice. Pelo mesmo motivo, se houver muitos resíduos adjacentes de Lys e/ou Arg, que apresentam grupos R positivamente carregados em pH 7, haverá uma repulsão entre eles, o que impedirá a formação da α-hélice. O volume e a forma de resíduos de Asn, Ser, Thr e Cys também podem desestabilizar uma α-hélice, se eles estiverem muito próximos na cadeia.

A estrutura de uma α-hélice faz com que as interações críticas ocorram entre uma cadeia lateral de um aminoácido e uma cadeia lateral do terceiro (e, às vezes, do quarto) resíduo de aminoácido a partir daquele, tanto em uma direção como em outra (Fig. 6-5). Aminoácidos positivamente carregados freqüentemente se encontram afastados de aminoácidos negativamente carregados por três resíduos, permitindo a formação de um par iônico. Dois resíduos de aminoácidos aromáticos aparecem, com freqüência, espaçados de modo semelhante, resultando em uma interação hidrofóbica.

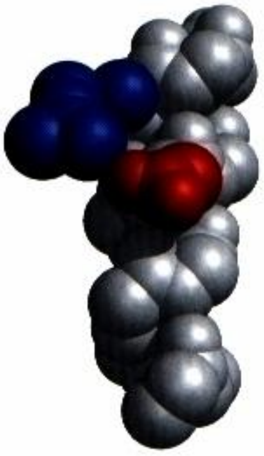


Figura 6-5 – Interações entre os grupos R de aminoácidos distantes três resíduos entre si, em uma α-hélice. Uma interação iônica entre Asp^{100} e Arg^{103} em uma região α-helicoidal da proteína troponina C, uma proteína ligante de cálcio associada com o tecido muscular, é mostrada neste modelo espaço-cheio. A estrutura polipeptídica (carbonos, nitrogênios α-amino e oxigênios α-carbonílicos) é mostrada em cinza para um segmento helicoidal de 13 resíduos. As únicas cadeias laterais aqui representadas são os resíduos interagentes Asp (em vermelho) e Arg (em azul).

Um impedimento para a formação de uma α-hélice é a presença de resíduos de Pro ou Gly. Na prolina, o átomo de nitrogênio faz parte de um anel rígido (veja Fig. 6-8b), e a rotação em torno da ligação N—C$_\alpha$ não é possível. Assim, um resíduo de Pro introduz uma dobra desestabilizadora em uma α-hélice. Além disso, o átomo de nitrogênio de um resíduo de Pro em uma ligação peptídica não possui nenhum hidrogênio substituinte que possa participar de ligações de hidrogênio com outros resíduos. Por esses motivos, a prolina é raramente encontrada em uma α-hélice. A glicina ocorre com pouca freqüência em α-hélices por uma razão diferente: possui uma flexibilidade conformacional maior do que a dos demais resíduos de aminoácidos. Os polímeros de glicina tendem a assumir estruturas enoveladas bem distintas de uma α-hélice.

Um último fator que afeta a estabilidade de uma α-hélice em um polipeptídeo é a identidade dos resíduos de aminoácidos próximos das extremidades de um segmento α-helicoidal. Um pequeno dipolo elétrico existe em cada ligação peptídica (Fig. 6-2a). Esses dipolos são conectados entre si por ligações de hidrogênio da hélice, resultando em um dipolo resultante tanto maior quanto maior for o comprimento da hélice (Fig. 6-6). Os quatro resíduos de aminoácidos em cada extremidade da hélice não participam completamente das ligações de hidrogênio da hélice. As cargas parciais positivas e negativas do dipolo da hélice, na verdade, residem nos grupos amino e carbonila próximos da extremidade aminoterminal e da extremidade carboxiterminal, respectivamente. Por esse motivo, os aminoácidos negativamente carregados encontram-se, com freqüência, mais próximos do aminoterminal de um segmento helicoidal, onde podem sofrer uma interação estabilizadora com a carga positiva do dipolo da hélice; um aminoácido positivamente carregado na extremidade aminoterminal é desestabilizante. O oposto é válido para a extremidade carboxiterminal do segmento helicoidal.

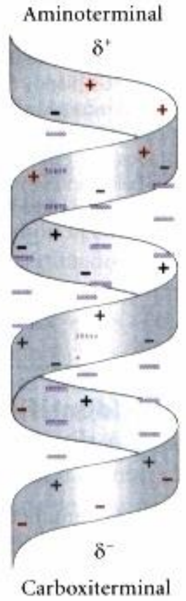


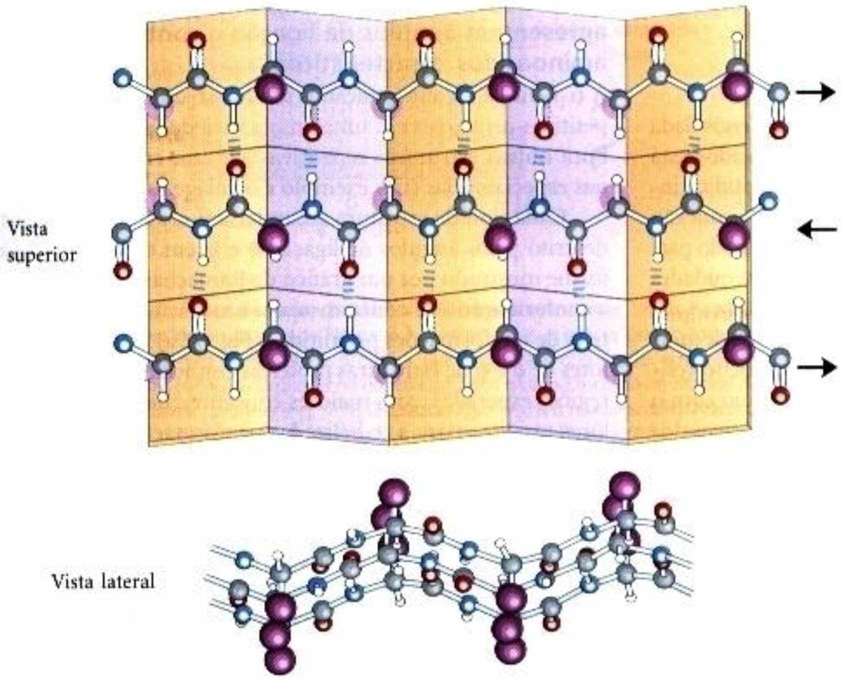
Figura 6-6 – O dipolo elétrico de uma ligação peptídica (veja Fig. 6-2a) é transmitido ao longo de um segmento α-helicoidal por meio de ligações de hidrogênio intracadeia, resultando em um dipolo que abrange toda a hélice. Nesta ilustração, os grupos amino e carbonila constituintes de cada ligação peptídica são indicados pelos símbolos + e −, respectivamente. Os grupos amino e carbonila que são constituintes das ligações peptídicas próximas às extremidades da região α-helicoidal e não participam de ligações de hidrogênio são mostrados em vermelho.

Assim, cinco tipos distintos de restrições afetam a estabilidade de uma α-hélice: (1) a repulsão eletrostática (ou atração) entre resíduos de aminoácidos sucessivos com grupos R carregados; (2) o volume dos grupos R adjacentes; (3) as interações entre as cadeias laterais de aminoácidos espaçados entre si por três ou quatro resíduos; (4) a ocorrência de resíduos de Pro e Gly; e (5) a interação entre os resíduos de aminoácidos nas extremidades do segmento helicoidal e o dipolo elétrico inerente a uma α-hélice. Dessa forma, a tendência de um dado segmento de uma cadeia polipeptídica enovelar-se como uma α-hélice depende da identidade e da seqüência de resíduos de aminoácidos desse segmento.

A conformação β organiza as cadeias polipeptídicas em folhas

Pauling e Corey predisseram um segundo tipo de estrutura repetitiva, a **conformação β**. Esta é uma conformação mais estendida das cadeias polipeptídicas, e sua estrutura foi confirmada por análises de raios X. Na conformação β, a cadeia polipeptídica estende-se em uma estrutura em ziguezague em vez de helicoidal (Fig. 6-7). As cadeias polipeptídicas em ziguezague podem ser dispostas lado a lado, para formar uma estrutura que se assemelha a uma série de pregas. Nesse arranjo, denominado **folha β** ("β sheet"), as ligações de hidrogênio são formadas entre os segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica. Os segmentos individuais que formam uma folha β geralmente estão próximos entre si na cadeia polipeptídica, mas podem também estar bem distantes uns dos outros na seqüência linear do polipeptídeo; podem até mesmo ser segmentos em cadeias polipeptídicas distintas. Os grupos R de aminoácidos adjacentes projetam-se em direções opostas a partir da estrutura em ziguezague, criando um padrão alternado, como observado nas vistas laterais da Figura 6-7.

(**a**) **Antiparalela**



(**b**) **Paralela**

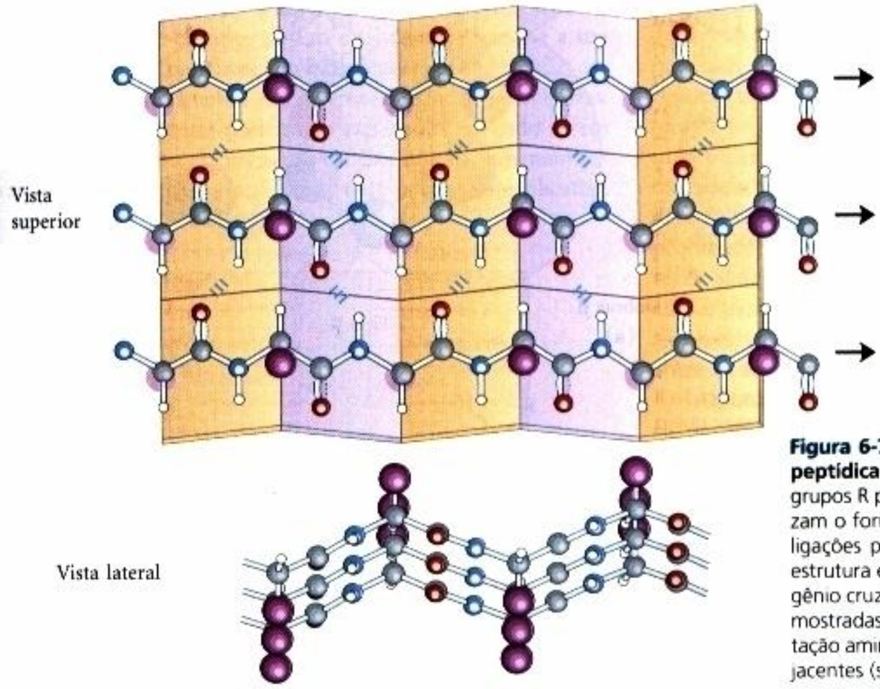


Figura 6-7 – A conformação β das cadeias polipeptídicas. As vistas superiores e laterais revelam os grupos R projetando-se para fora da folha β e enfatizam o formato pregueado descrito pelos planos das ligações peptídicas (um nome alternativo para essa estrutura é folha pregueada β). As ligações de hidrogênio cruzadas entre cadeias adjacentes também são mostradas. (**a**) Folha β antiparalela, na qual a orientação aminoterminal–carboxiterminal das cadeias adjacentes (setas) é inversa. (**b**) Folha β paralela.

As cadeias polipeptídicas adjacentes em uma folha β podem ser paralelas ou antiparalelas (com orientações amino e carboxila iguais ou diferentes, respectivamente). As estruturas são um tanto quanto semelhantes entre si, apesar de o período de repetição ser menor para a conformação paralela (6,5Å *versus* 7Å para a antiparalela) e os padrões de ligações de hidrogênio serem também diferentes.

Algumas estruturas protéicas limitam os tipos de aminoácidos que podem ocorrer em uma folha β. Quando duas ou mais folhas β são mantidas juntas em uma proteína, os grupos R dos resíduos de aminoácidos das superfícies em contato devem ser relativamente pequenos. As β-queratinas, como a fibroína da seda e a fibroína das teias de aranha, apresentam um conteúdo elevado de resíduos de Gly e Ala, os dois aminoácidos com os menores grupos R. Na verdade, na fibroína da seda, Gly e Ala alternam-se em largas extensões da seqüência.

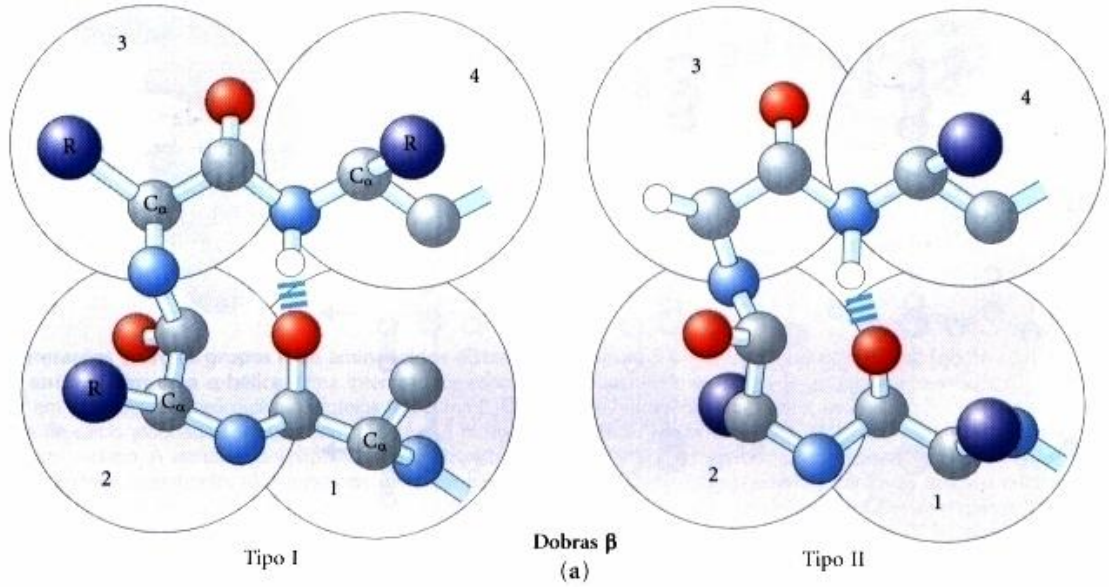
As dobras β são comuns nas proteínas

Nas proteínas globulares que possuem uma estrutura enovelada compacta, cerca de um terço dos resíduos de aminoácidos está situado em dobras ou voltas nas quais a cadeia polipeptídica inverte a sua direção (Fig. 6-8). Esses são os elementos de conexão entre trechos sucessivos de α-hélices ou conformações β. São particularmente comuns as **dobras β** que conectam as extremidades de dois segmentos adjacentes de uma folha β antiparalela. A estrutura é uma dobra de 180° que envolve quatro resíduos de aminoácidos, com o grupo de oxigênio carbonílico do primeiro resíduo de aminoácido formando uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do grupo amino do quarto. Os grupos peptídicos dos dois resíduos centrais não participam de qualquer ligação de hidrogênio inter-residual. Os resíduos de Gly e Pro freqüentemente aparecem nas dobras β, o primeiro por ser pequeno e flexível e o último porque as ligações peptídicas que envolvem o nitrogênio imínico da prolina facilmente assumem a configuração cis (Fig. 6-8b), uma forma que é particularmente suscetível de se dobrar. Dos diversos tipos de dobras β, os dois apresentados na Figura 6-8 são os mais comuns. As dobras β são freqüentemente encontradas próximo da superfície das proteínas, na qual os grupos peptídicos dos resíduos centrais de aminoácidos na dobra podem formar ligações de hidrogênio com a água. Consideravelmente menos comum é a dobra γ, uma dobra de três resíduos com uma ligação de hidrogênio entre o primeiro e o terceiro resíduo.

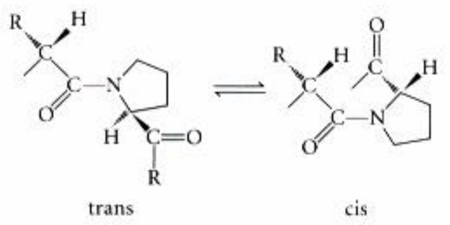
Estruturas secundárias comumente encontradas apresentam ângulos de ligação e conteúdo de aminoácidos característicos

A α-hélice e a conformação β são as estruturas secundárias repetitivas principais em uma ampla variedade de proteínas, embora outras estruturas repetitivas existam em algumas proteínas especializadas (um exemplo é o colágeno, veja Fig. 6-13).

Cada tipo de estrutura secundária pode ser completamente descrito pelos ângulos de ligação ϕ e ψ em cada resíduo. Conforme mostrado por um gráfico de Ramachandran, a α-hélice e a conformação β encontram-se em uma faixa relativamente restrita de conformações permitidas (Fig. 6-9a). A maioria dos valores de ϕ e ψ de estruturas protéicas conhecidas encontra-se em regiões esperadas, com maiores concentrações próximo dos valores preditos para a α-hélice e a conformação β (Fig. 6-9b). O

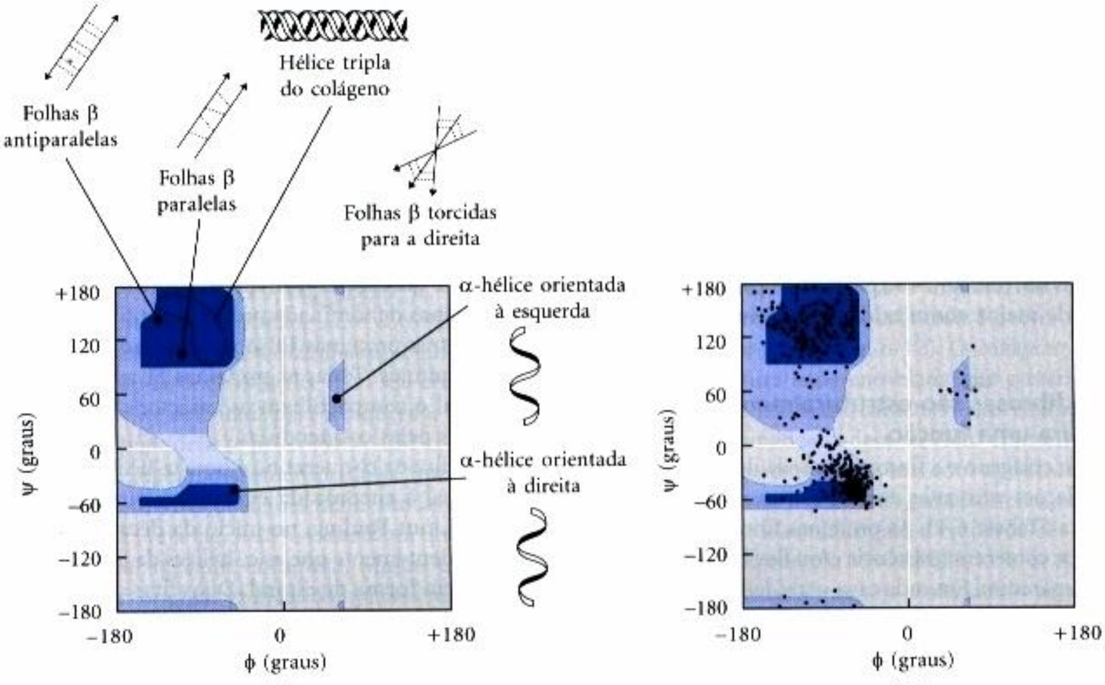


Dobras β
(a)



Isômeros de prolina
(b)

Figura 6-8 – Estruturas das dobras β. (**a**) As dobras β dos tipos I e II são as mais comuns; o tipo I ocorre com uma freqüência maior que o dobro da do tipo II. As dobras β do tipo II sempre apresentam Gly como terceiro resíduo. Observe a ligação de hidrogênio entre os grupos peptídicos do primeiro e quarto resíduos (os resíduos de aminoácidos individuais são emoldurados por grandes círculos azuis). (**b**) Os isômeros cis e trans de uma ligação peptídica que envolve o nitrogênio imínico da prolina. Mais de 99,95% das ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos, que não a prolina, estão na configuração trans. Nas ligações peptídicas que envolvem o nitrogênio imínico da prolina, no entanto, cerca de 6% estão na configuração cis; muitos deles ocorrem nas dobras β.



(a) (b)

Figura 6-9 – Gráficos de Ramachandran de diversas estruturas. (**a**) Os valores de ϕ e ψ para diversas estruturas secundárias possíveis estão sobrepostos no gráfico da Figura 6-3. Apesar de as α-hélices orientadas para a esquerda, estendendo-se por diversos resíduos de aminoácidos, serem teoricamente possíveis, elas não foram observadas em proteínas. (**b**) Os valores de ϕ e ψ para todos os resíduos de aminoácidos, à exceção da glicina na enzima piruvato quinase (isolada de tecidos de coelho), estão sobrepostos no gráfico das conformações teoricamente possíveis (Fig. 6-3). Os pequenos e flexíveis resíduos de Gly foram excluídos, porque freqüentemente se encontram fora das faixas esperadas (em azul). (Dados para (**b**), cortesia de Hazel Holden, Instituto de Enzimas da Universidade de Wisconsin.)

único resíduo de aminoácido freqüentemente encontrado em uma conformação situada fora dessas regiões é a glicina. Devido à sua cadeia lateral — um único átomo de hidrogênio — ser pequena, um resíduo de Gly pode participar de muitas conformações que são estericamente impedidas para outros aminoácidos.

Alguns aminoácidos são mais bem acomodados do que outros nos diferentes tipos de estruturas secundárias. Um quadro geral resumido é apresentado na Figura 6-10. Alguns desvios, como a presença comum de resíduos de Pro e Gly em dobras β e a sua ausência relativa nas α-hélices, são facilmente explicados pelas conhecidas restrições existentes nas diversas estruturas secundárias. Outros desvios evidentes podem ser explicados, levando-se em conta os tamanhos ou as cargas das cadeias laterais, mas nem todas as tendências observadas na Figura 6-10 podem ser explicadas.

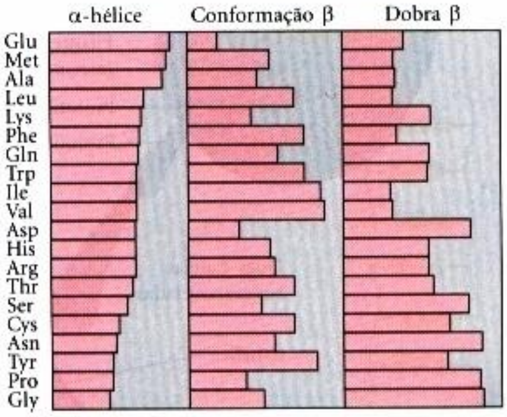


Figura 6-10 – Probabilidade relativa de que um determinado resíduo de aminoácido ocorrerá nos três tipos mais comuns de estrutura secundária.

Estruturas Terciárias e Quaternárias das Proteínas

O arranjo tridimensional global de todos os átomos em uma proteína é denominado **estrutura terciária** das proteínas. Enquanto o termo "estrutura secundária" se refere ao arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos que são adjacentes na estrutura primária, a estrutura terciária inclui aspectos envolvendo *distâncias mais longas* dentro da seqüência de aminoácidos. Aminoácidos que estão distantes na seqüência polipeptídica e que residem em tipos diferentes de estrutura secundária podem interagir no interior de uma estrutura totalmente enovelada de uma proteína. A localização de dobras (incluindo as dobras β) na cadeia polipeptídica e a direção e o ângulo dessas dobras são determinados pelo número e localização dos resíduos que as produzem, tais como Pro, Thr, Ser e Gly. Segmentos interagentes de cadeias polipeptídicas são mantidos em suas posições terciárias características por tipos distintos de interações fracas (e, às vezes, por ligações covalentes tais como ligações dissulfeto) entre os segmentos.

Alguns peptídeos contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas separadas ou subunidades que podem ser idênticas ou não. O arranjo dessas subunidades protéicas em complexos tridimensionais constitui a **estrutura quaternária**.

Ao considerarmos esses níveis mais elevados de organização estrutural, torna-se interessante classificar as proteínas em dois grupos principais: as **proteínas fibrosas**, que possuem cadeias polipeptídicas em arranjos de folhas ou feixes, e as **proteínas globulares**, que possuem cadeias polipeptídicas enoveladas em formas esféricas ou globulares. Os dois grupos são estruturalmente distintos: as proteínas fibrosas em geral consistem principalmente de um único tipo de estrutura secundária; as proteínas globulares costumam conter diversos tipos de estruturas secundárias. Os-grupos diferem funcionalmente, uma vez que as proteínas fibrosas fornecem suporte, formas e proteção externa aos vertebrados, enquanto as enzimas e as proteínas regulatórias, na maioria, são proteínas globulares. Algumas proteínas fibrosas tiveram importância fundamental na compreensão atual da estrutura protéica e fornecem exemplos claros das relações existentes entre estrutura e função. Iniciaremos nossa discussão com as proteínas fibrosas antes de passarmos para os padrões de enovelamento de maior complexidade observados nas proteínas globulares.

As proteínas fibrosas são estruturalmente adaptadas para uma função

A α-queratina, o colágeno e a fibroína da seda ilustram de forma adequada as relações existentes entre a estrutura protéica e sua função biológica (Tabela 6-1). As proteínas fibrosas apresentam propriedades que conferem resistência e/ou flexibilidade às estruturas nas quais aparecem. Em cada caso, a unidade estrutural fundamental é um simples elemento repetitivo de estrutura secundária. Todas as proteínas fibrosas são insolúveis em água, uma propriedade devida à elevada concentração de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos tanto no interior da proteína como em sua superfície. Essas superfícies hidrofóbicas são encobertas pelo empacotamento de cadeias polipeptídicas semelhantes juntas entre si, formando elaborados complexos supramoleculares. A simplicidade estrutural subjacente das proteínas fibrosas as torna particularmente úteis para ilustrar alguns dos princípios fundamentais da estrutura protéica discutidos anteriormente.

α-queratina. As α-queratinas evoluíram no sentido de serem resistentes. Encontradas em mamíferos, essas proteínas constituem quase todo o peso seco dos cabelos, lã, unhas, garras, espinhos, chifres, cascos e a maior parte da camada externa da pele. As α-queratinas formam parte de uma família mais ampla de proteínas denominada proteínas de filamento intermediário (FI). Outras proteínas FI são encontradas no citoesqueleto de células animais. Todas as proteínas FI apresentam uma função estrutural e compartilham as características estruturais exemplificadas pelas α-queratinas.

A hélice da α-queratina é uma α-hélice orientada para a direita, igual à encontrada em muitas outras proteínas. Francis Crick e Linus Pauling, no início da década de 1950, sugeriram independentemente que as α-hélices da queratina possuíam um arranjo em forma de espiral. Duas fitas de α-queratinas, orientadas em paralelo (com seus aminoterminais na mesma extremidade), enovelam-se uma à outra para formar uma espiral super-retorcida. Esses superenovelamento amplifica a resistência da estrutura como um todo, como se fosse uma corda resistente (Fig. 6-11), e explica a discrepância existente entre o passo de 5,4Å predito para uma α-hélice por Pauling e Corey e a estrutu-

Tabela 6-1 – Estrutura secundária e propriedades de proteínas fibrosas

Estrutura	Características	Exemplos de ocorrência
α-hélice com ligações dissulfeto	Estruturas endurecidas e protetoras com graus variáveis de dureza e flexibilidade	α-queratina do cabelo, penas e unhas
Conformação β	Filamentos macios e flexíveis	Fibroína da seda
Tripla hélice do colágeno	Alta força tensional sem estiramento	Colágeno de tendões, matriz óssea

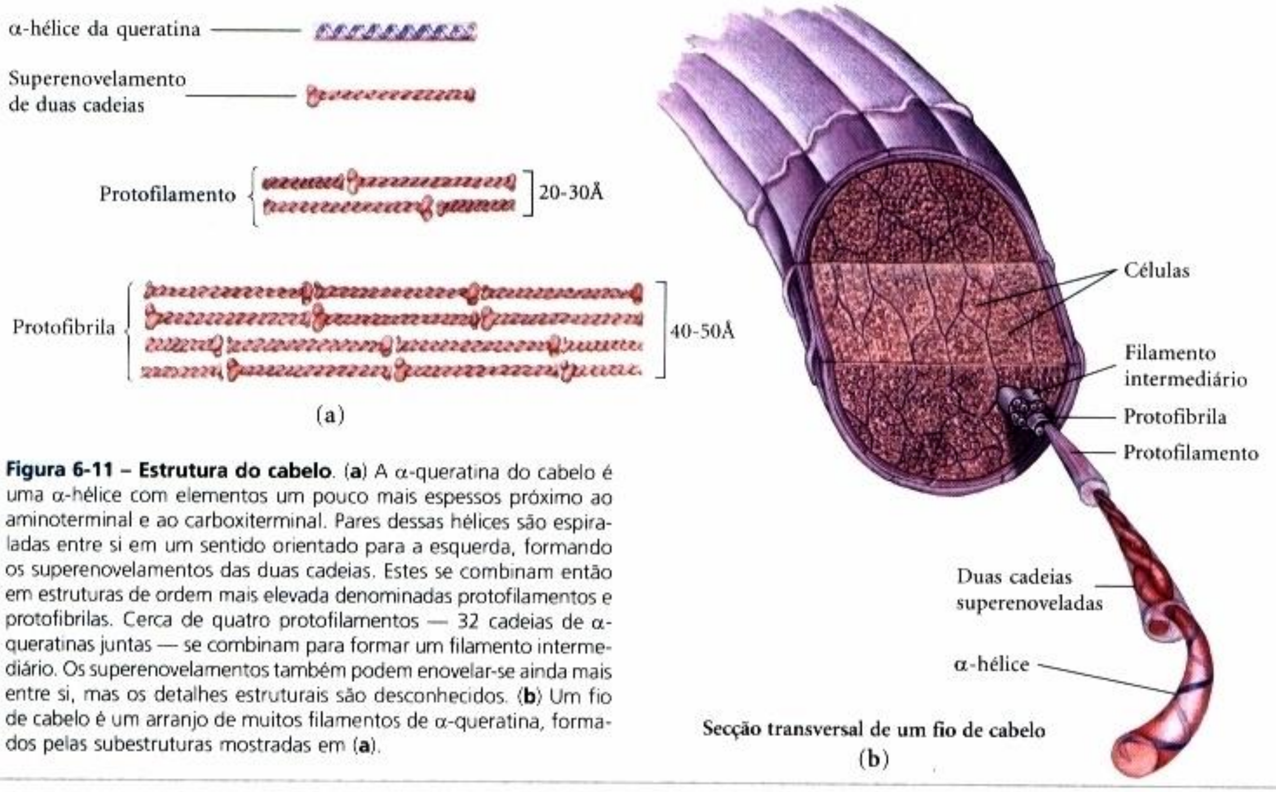


Figura 6-11 – Estrutura do cabelo. (**a**) A α-queratina do cabelo é uma α-hélice com elementos um pouco mais espessos próximo ao aminoterminal e ao carboxiterminal. Pares dessas hélices são espiraladas entre si em um sentido orientado para a esquerda, formando os superenovelamentos das duas cadeias. Estes se combinam então em estruturas de ordem mais elevada denominadas protofilamentos e protofibrilas. Cerca de quatro protofilamentos — 32 cadeias de α-queratinas juntas — se combinam para formar um filamento intermediário. Os superenovelamentos também podem enovelar-se ainda mais entre si, mas os detalhes estruturais são desconhecidos. (**b**) Um fio de cabelo é um arranjo de muitos filamentos de α-queratina, formados pelas subestruturas mostradas em (**a**).

ra repetitiva de 5,15 a 5,2Å observada na difração de raios X da proteína do cabelo. O percurso da hélice superenovelada é orientado para a esquerda, em oposição ao sentido de uma α-hélice. As superfícies nas quais ocorre o contato das duas hélices são constituídas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos cujos grupos R se misturam, formando um padrão de travas internas regulares. Isso permite um empacotamento denso das cadeias polipeptídicas no interior do superenovelamento orientado para a esquerda. De forma não surpreendente, a α-queratina é rica em resíduos hidrofóbicos de Ala, Val, Leu, Ile, Met e Phe.

Um polipeptídeo integrante da hélice superenovelada da α-queratina apresenta uma estrutura terciária simples, dominada por uma estrutura secundária de α-hélice com seu eixo enovelando em uma super-hélice orientada para a esquerda. Esse enovelamento de dois polipeptídeos α-helicoidais é um exemplo de estrutura quaternária. Superenovelamentos desse tipo são elementos estruturais comuns nas proteínas filamentosas e na proteína muscular miosina (veja Fig. 7-29). A estrutura quaternária da α-queratina pode ser bastante complexa. Muitas estruturas superenoveladas podem originar grandes complexos supramoleculares, como por exemplo o arranjo da α-queratina para formar o filamento intermediário do cabelo (Fig. 6-11b).

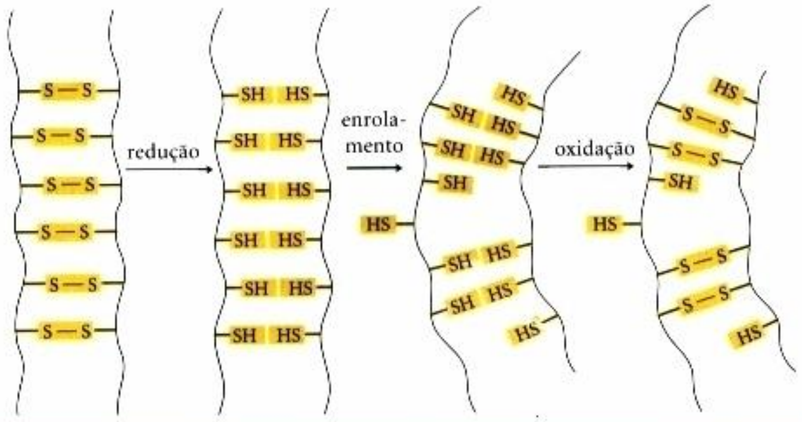
A resistência das proteínas fibrosas é aumentada por ligações covalentes cruzadas entre as cadeias polipeptídicas no interior das "cordas" e entre cadeias adjacentes em uma estrutura supramolecular. Nas α-queratinas, as ligações cruzadas que estabilizam a estrutura quaternária são as ligações dissulfeto (Adendo 6-2). Nas α-queratinas mais rígidas, como a dos chifres de rinocerontes, até 18% dos resíduos são cisteínas envolvidas em ligações dissulfeto.

Colágeno. Da mesma forma que as α-queratinas, o colágeno evoluiu no sentido de fornecer resistência mecânica. É encontrado em tecidos conjuntivos como tendões, cartilagens, na matriz orgânica dos ossos e na córnea dos olhos. A hélice do colágeno é uma estrutura secundária singular, bem distinta de uma α-hélice. É orientada para a esquerda e possui três resíduos de aminoácidos por passo (Fig. 6-12). O colágeno apresenta também uma estrutura superenovelada que possui uma estrutura terciária e uma quaternária características: três polipeptídeos separados, denominados cadeias α (não confundir com α-hélices), que são superenovelados uns com os outros (Fig. 6-12c). O superenovelamento é orientado para a direita, em sentido oposto ao das hélices orientadas para a esquerda das cadeias α.

O colágeno apresenta 35% de Gly, 11% de Ala e 21% de Pro de HyPro (hidroxiprolina, um aminoácido não-primário; veja Fig. 5-8). A gelatina, um produto alimentar derivado do colágeno, apresenta um pequeno valor nutricional como proteína porque o colágeno é bem pobre em diversos aminoácidos essenciais para a dieta humana. O conteúdo não habitual de aminoácidos do colágeno está relacionado às restrições estruturais características da hélice do colágeno. A seqüência de aminoácidos no co-

Adendo 6-2 A ondulação permanente em cabelos é uma engenharia bioquímica

Quando o cabelo é exposto ao calor úmido, pode ser esticado. Em nível molecular, as α-hélices na α-queratina do cabelo são esticadas até atingirem uma conformação β completamente estendida. Após resfriamento, ocorre uma reversão espontânea à conformação α-helicoidal. A capacidade de se esticar apresentada pelas α-queratinas, bem como suas numerosas ligações dissulfeto cruzadas, formam a base da ondulação permanente. O cabelo a ser ondulado ou enrolado é primeiramente mantido preso a um molde com formato adequado. Uma solução de um agente redutor, geralmente um composto que contém um grupo tiol ou sulfidrila (—SH), é, a seguir, aplicado sob aquecimento. O agente redutor cliva as ligações cruzadas, reduzindo cada ligação dissulfeto e formando dois resíduos de Cys. O calor úmido rompe as ligações de hidrogênio e causa o desenovelamento das estruturas α-helicoidais das cadeias polipeptídicas. Após certo tempo, a solução redutora é removida e um agente oxidante é adicionado para formar *novas* ligações dissulfeto entre pares de resíduos Cys de cadeias polipeptídicas adjacentes, mas que não serão os mesmos pares existentes antes do tratamento. Após o cabelo ser lavado e resfriado, as cadeias polipetídicas revertem à sua conformação α-helicoidal. As fibras do cabelo agora se curvam no formato desejado porque as novas ligações dissulfeto exercem alguma torção ou dobramento nos feixes α-helicoidais das fibras do cabelo. Uma ondulação permanente não é verdadeiramente permanente porque o cabelo cresce; no cabelo novo que substitui o antigo, a α-queratina possui o padrão natural das ligações dissulfeto do cabelo não ondulado.



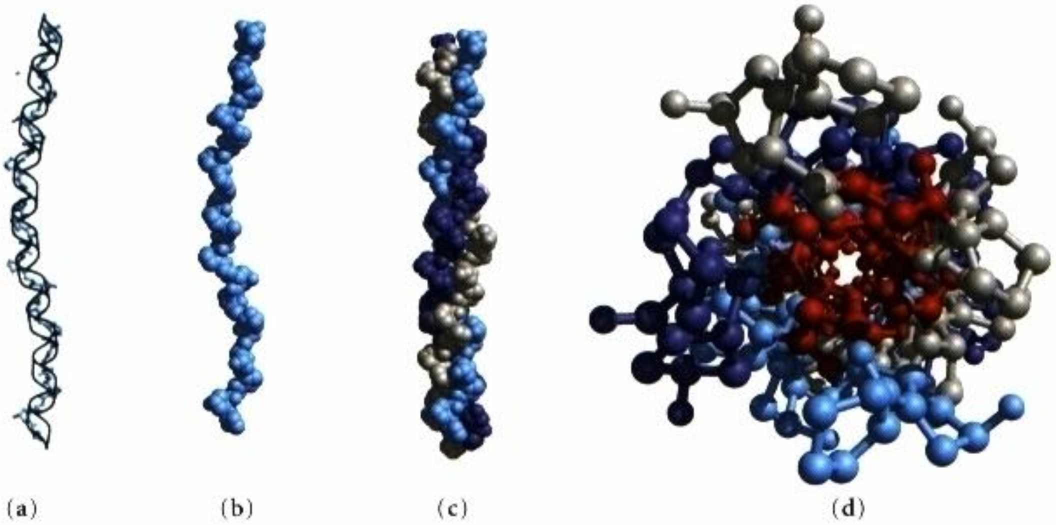


Figura 6-12 – Estrutura do colágeno. (**a**) A cadeia α do colágeno apresenta uma estrutura secundária repetitiva característica dessa proteína. A seqüência tripeptídica repetitiva Gly–X–Pro ou Gly–X–HyPro adota uma estrutura helicoidal orientada para a esquerda com três resíduos por passo. A seqüência repetitiva utilizada para gerar este modelo é Gly–Pro–HyPro. (**b**) Modelo espaço-cheio da mesma cadeia α. (**c**) Três dessas hélices (mostradas aqui em cinza, azul-claro e azul-escuro) enovelam-se umas às outras em um superenovelamento orientado para a direita. (**d**) A super-hélice de três cadeias do colágeno vistas a partir de uma extremidade, em um modelo bola-e-bastão. Os resíduos de Gly são mostrados em vermelho. A glicina, devido a seu pequeno tamanho, é necessária na junção estreita em que as três cadeias estão em contato. As bolas nesta ilustração não representam o raio de van der Waals dos átomos individuais. O centro da super-hélice de três cadeias não é vazio como aparece aqui, mas densamente empacotado.

lágeno apresenta, em geral, uma unidade repetitiva tripeptídica, Gly–X–Pro ou Gly–X–HyPro, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido. Apenas os resíduos de glicina podem ser acomodados nas junções extremamente estreitas existentes entre as cadeias α individuais (Fig. 6-12d); os resíduos de Pro possibilitam os enovelamentos acentuados que se verificam na hélice do colágeno. A seqüência de aminoácidos e a estrutura quaternária superenovelada do colágeno permitem um empacotamento denso de seus três polipeptídeos.

Esse empacotamento denso das cadeias α na hélice tripla do colágeno fornece uma força tensional maior do que a de um fio de aço de idêntica secção transversal. As fibrilas do colágeno (Fig. 6-13) são estruturas supramoleculares que consistem de moléculas de tripla hélice de colágeno (algumas vezes denominadas de moléculas de tropocolágeno), associadas de diversas maneiras a fim de fornecer diferentes graus de força tensional. As cadeias α das moléculas do colágeno e as moléculas de colágeno das fibrilas são unidas por tipos não habituais de ligações covalentes cruzadas, envolvendo resíduos de Lys, HyLys (hidroxilisina, veja Fig. 5-8) ou His. Essas ligações criam resíduos de aminoácidos não-primários, como a desidro-hidroxilisinonorleucina (veja pág. seguinte). O aumento na rigidez e a inelasticidade do tecido conjuntivo à medida que as pessoas envelhecem resultam de uma acumulação de ligações covalentes cruzadas nas fibrilas de colágeno.

Um mamífero típico possui mais de 30 variantes estruturais de colágeno que ocorrem em tecidos particulares. Cada um deles é um pouco diferente em seqüência e função. Alguns defeitos genéticos humanos na estrutura do colágeno ilustram a relação próxima que existe entre a seqüência de aminoácidos e a estrutura tridimensional dessa proteína. A *osteogenesis imperfecta* é caracterizada por uma formação óssea anormal em bebês; e a síndrome de Ehlers-Danlos, por juntas frouxas. Ambas as condições podem ser letais e resultam da substituição por um resíduo de aminoácido com um grupo R maior (como a Cys ou Ser) de um resíduo de Gly em cada cadeia α (um resíduo dife-

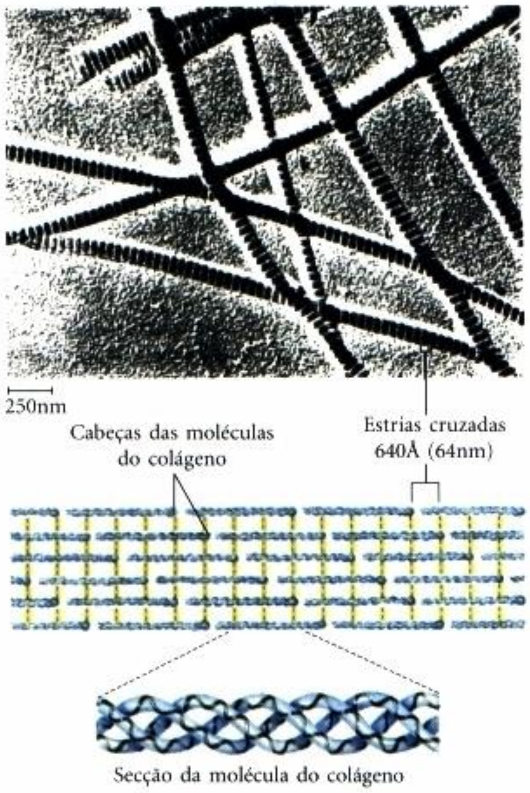
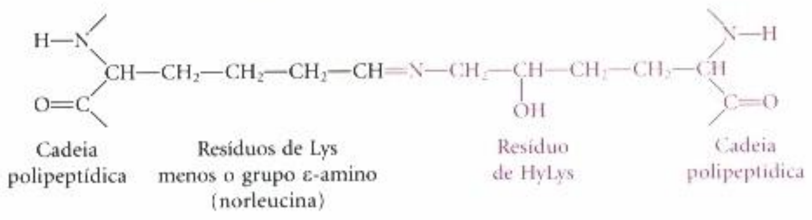

250nm
Cabeças das moléculas do colágeno
Estrias cruzadas 640Å (64nm)
Secção da molécula do colágeno

Figura 6-13 – Estrutura das fibrilas do colágeno. O colágeno (M_r 300.000) é uma molécula em forma de bastão, com cerca de 3.000Å de comprimento por apenas 15Å de largura. Suas três cadeias α superenoveladas podem ter seqüências diferentes, mas cada uma apresenta cerca de 1.000 resíduos de aminoácidos. As fibrilas do colágeno são formadas por moléculas de colágeno alinhadas em um padrão em forma de escada e apresentam ligações cruzadas para uma maior resistência mecânica. O alinhamento específico e a quantidade de ligações cruzadas variam de acordo com o tecido e produzem estrias características em uma micrografia eletrônica. No exemplo aqui mostrado, o alinhamento dos grupos-cabeça de cada quatro moléculas produz estrias afastadas por 640Å.


H—N
CH—CH₂—CH₂—CH₂—CH=N—CH₂—CH—CH₂—CH₂—CH
O=C
OH
N—H
C=O
Cadeia polipeptídica
Resíduos de Lys menos o grupo ε-amino (norleucina)
Resíduo de HyLys
Cadeia polipeptídica

Desidro-hidroxilisinonorleucina

rente de Gly em cada desordem). Essas substituições de um único resíduo têm um efeito catastrófico sobre a função do colágeno porque elas rompem a repetição Gly–X–Pro que dá ao colágeno a sua estrutura helicoidal característica. Dado o seu papel na hélice tripla do colágeno (Fig. 6-12d), Gly não pode ser substituído por outro resíduo de aminoácido sem causar efeitos substancialmente deletérios na estrutura.

Fibroína da seda. Fibroína, a proteína da seda, é produzida por insetos e aracnídeos. Suas cadeias polipeptídicas estão predominantemente na conformação β. A fibroína é rica em resíduos de Ala e Gly, permitindo um empacotamento denso dos grupos R e um arranjo em que os grupos R estão em contato uns com os outros (Fig. 6-14). Toda a estrutura é estabilizada por diversas ligações de hidrogênio existentes entre todas as ligações peptídicas nos polipeptídeos de cada folha β e pela otimização das interações de van der Waals existentes entre as folhas. A seda não sofre estiramento porque a conformação β já é altamente estendida (Fig. 6-7; veja também Fig. 6-15). Entretanto, a estrutura é flexível, porque as folhas são mantidas juntas por numerosas interações fracas e não por ligações covalentes, como é o caso das ligações dissulfeto nas α-queratinas.

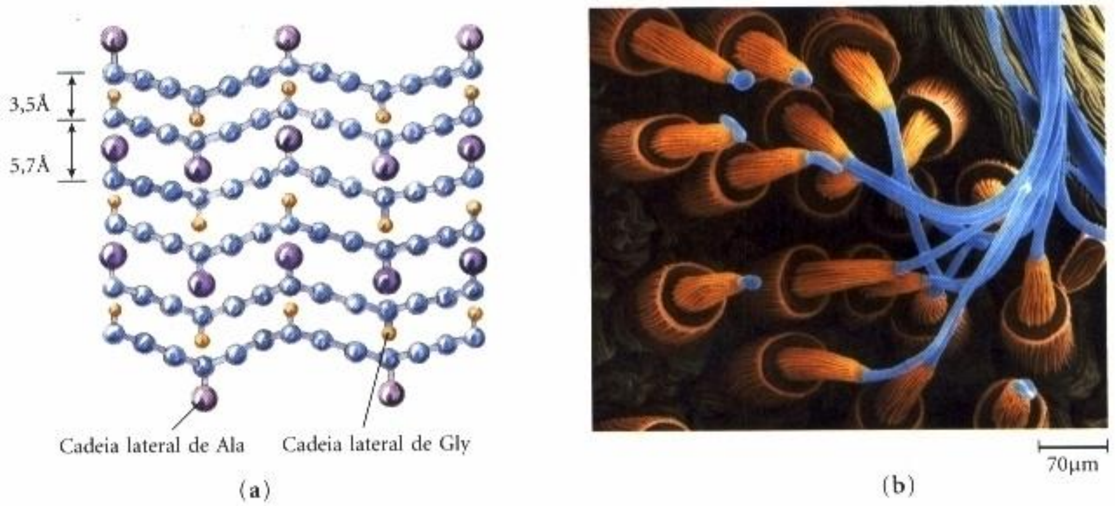

3,5Å
5,7Å
Cadeia lateral de Ala
Cadeia lateral de Gly
(a)
70μm
(b)

Figura 6-14 – A estrutura da seda. As fibras usadas para fazer a seda ou uma teia de aranha são constituídas pela proteína fibroína. (**a**) A fibroína consiste de camadas de folhas β antiparalelas, ricas em resíduos de Ala (em lilás) e Gly (em amarelo). As pequenas cadeias laterais estão em contato umas com as outras, o que permite um empacotamento denso de cada folha, conforme mostrado nesta vista lateral. (**b**) As cadeias de fibroína (em azul) emergem das fiandeiras de uma aranha nesta micrografia eletrônica colorizada.

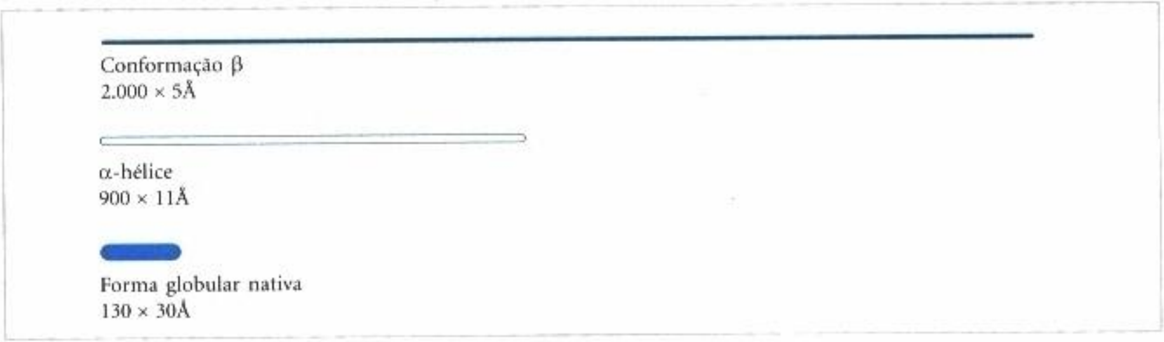

Conformação β
2.000 × 5Å
α-hélice
900 × 11Å
Forma globular nativa
130 × 30Å

Figura 6-15 – Estruturas protéicas globulares são compactas e variadas. A soroalbumina humana (M_r 64.500) possui 585 resíduos em uma única cadeia. Aqui são mostradas as dimensões aproximadas que a sua única cadeia polipeptídica teria se ocorresse na conformação β estendida ou como α-hélice. O tamanho verdadeiro da proteína em sua forma globular nativa, conforme determinado por medidas físico-químicas, também é mostrado; a cadeia polipeptídica deve estar bem compactada para caber nessas dimensões.

A diversidade estrutural reflete a diversidade funcional nas proteínas globulares

Em uma proteína globular, os diferentes segmentos de uma cadeia polipeptídica (ou múltiplas cadeias polipeptídicas) enovelam-se uns sobre os outros. Conforme ilustrado na Figura 6-15, esse enovelamento gera uma forma compacta em relação aos polipeptídeos em uma conformação totalmente estendida. O enovelamento também gera a diversidade estrutural necessária para que as proteínas executem um grande conjunto de funções biológicas. As proteínas globulares incluem as enzimas, as proteínas transportadoras, as proteínas motoras, as proteínas regulatórias, as imunoglobulinas e as proteínas com diversas outras funções.

Neste início de novo milênio, o número de estruturas tridimensionais de proteínas conhecidas está na casa dos milhares e mais do que dobra a cada dois anos. Esse vigor da informação estrutural está revolucionando nossa compreensão da estrutura protéica, a relação entre estrutura e função e até mesmo os caminhos evolutivos pelos quais as proteínas atingiram o presente estado, o que pode ser visualizado pelas semelhanças existentes entre famílias de proteínas reveladas à medida que os bancos de dados de proteínas são vasculhados e classificados. A variedade absoluta de estruturas pode parecer intimidante; no entanto, à medida que novas estruturas protéicas se tornam disponíveis, torna-se cada vez mais claro que elas são manifestações de um conjunto finito de padrões reconhecíveis de enovelamento estáveis.

Nossa discussão sobre a estrutura das proteínas globulares inicia-se com os princípios obtidos a partir das primeiras estruturas protéicas a serem elucidadas. Segue-se uma descrição detalhada da subestrutura protéica e a categorização comparativa. Tais discussões somente são possíveis devido à vasta quantidade de informações disponíveis na internet em recursos tais como o Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank, PDB), um arquivo de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas experimentalmente determinadas.

A mioglobina forneceu as primeiras evidências sobre a complexidade da estrutura protéica globular

O primeiro marco na compreensão da estrutura tridimensional de uma proteína globular surgiu a partir de estudos de difração de raios X da mioglobina, executados por John Kendrew e seus colegas nos anos 1950. A mioglobina é uma proteína ligante de oxigênio relativamente pequena (M_r 16.700), presente nas células musculares. Sua função é armazenar oxigênio e facilitar a difusão deste no tecido muscular em contração rápida. A mioglobina contém uma única cadeia polipeptídica de 153 resíduos de aminoácidos de seqüência conhecida e um único grupo de ferro protoporfirina ou heme. O mesmo grupo heme é encontrado na hemoglobina, a proteína ligadora de oxigênio dos eritrócitos; esse grupo é responsável pela forte cor vermelha a marrom tanto da mioglobina como da hemoglobina. A mioglobina é particularmente abundante nos músculos de animais aquáticos como a baleia, a foca e o boto cujos músculos são tão ricos dessa proteína que são marrons. O armazenamento e a distribuição do oxigênio pela mioglobina muscular permitem que esses animais permaneçam submersos por longos períodos de tempo.

A Figura 6-16 mostra diversas representações estruturais da mioglobina, ilustrando como a cadeia polipeptídica enovela-se em três dimensões — sua estrutura terciária. O grupo em vermelho cercado pela proteína é o heme. A estrutura da molécula de mioglobina é formada por oito segmentos de α-hélice relativamente retilíneos que são interrompidos por dobras, algumas das quais, dobras β. A α-hélice mais longa possui 23 resíduos de aminoácidos, e a mais curta, apenas sete; todas são orientadas para a direita. Mais de 70% dos resíduos de aminoácidos na mioglobina encontram-se nessas regiões α-helicoidais. A análise por raios X revelou a posição precisa de cada um dos grupos R, os quais ocupam quase todo o espaço no interior da cadeia enovelada.

Diversas conclusões importantes podem ser obtidas a partir da estrutura da mioglobina. O posicionamento das cadeias laterais dos aminoácidos refletem uma estrutura que obtém muito de sua estabilidade das interações hidrofóbicas. A maioria dos grupos R hidrofóbicos localiza-se no interior da molécula da mioglobina, ocultos da exposição à água. Todos os grupos R polares, exceto dois, localizam-se na superfície externa da molécula e todos são hidratados. A molécula de mioglobina é tão compacta que o seu interior apresenta espaço suficiente para apenas quatro moléculas de água. Esse núcleo hidrofóbico denso é típico das proteínas globulares. A fração do espaço ocupado pelos átomos em um líquido orgânico é de 0,4 a 0,6, em um cristal é de 0,70 a 0,78, valores próximos do máximo teórico. Em uma proteína globular, a fração é de cerca de 0,75, valor comparável ao de um cristal. Nesse meio densamente empacotado, as interações fracas são reforçadas entre si. Por exemplo, as cadeias apolares no interior da molécula estão tão juntas que as interações de van der Waals de curto alcance representam uma contribuição significativa para a estabilização das interações hidrofóbicas.

A dedução da estrutura da mioglobina confirmou algumas expectativas e introduziu alguns novos elementos de estrutura secundária. Como predito por Pauling e Corey, todas as ligações peptídicas estão na configuração plana trans. As α-hélices na mioglobina forneceram as primeiras evidências experimentais diretas para a existência desse tipo de estrutura secundária. Cada um dos quatro resíduos de Pro na mioglobina ocorre em uma dobra (lembre-se de que a prolina, com seu ângulo ϕ fixo e a ausência de um grupo peptídico N—H para participar de ligações de hidrogênio, é bem incompatível com a estrutura α-helicoidal). Outras dobras contêm resíduos de Ser, Thr e Asn, que estão entre os aminoácidos cujo volume e forma os tornam incompatíveis com a estrutura α-helicoidal se estiverem próximos na seqüência de aminoácidos (p. 128).

O grupo heme, plano, reside em uma cavidade ou bolsão no interior da molécula de mioglobina. O átomo de ferro no centro do grupo heme apresenta duas posições de ligação por coordenação perpendiculares ao plano do heme (Fig. 6-17). Uma delas está ligada ao grupo R do resíduo de His na posição 93; a outra é o sítio ao qual se liga uma molécula de O_2. No interior dessa cavidade, o acesso do grupo heme ao solvente é bastante restrito. Isso é de importância para a sua função, pois grupos heme livres em uma solução oxigenada são rapidamente oxidados da forma ferrosa (Fe^{2+}), que é ativa na ligação reversível do O_2, para a forma férrica (Fe^{3+}), que não liga O_2.

O conhecimento da estrutura da mioglobina permitiu aos pesquisadores entender em detalhe, pela primeira vez, a correlação existente entre a estrutura e a função de uma proteína. Centenas de proteínas foram submetidas a análises semelhantes desde então. Hoje, técnicas como a espectroscopia de RMN complementam os dados de difração de raios X, fornecendo mais informações sobre a estrutura de uma proteína (Adendo 6-3). O seqüenciamento do DNA genômico de diversos organismos (Capítulo 29) vem identificando milhares de genes que codificam proteínas de seqüências conhecidas mas função desconhecida. Nossa idéia inicial sobre a função dessas proteínas provém de nossa compreensão ainda limitada de como a estrutura primária determina a estrutura terciária e de como esta determina a função.

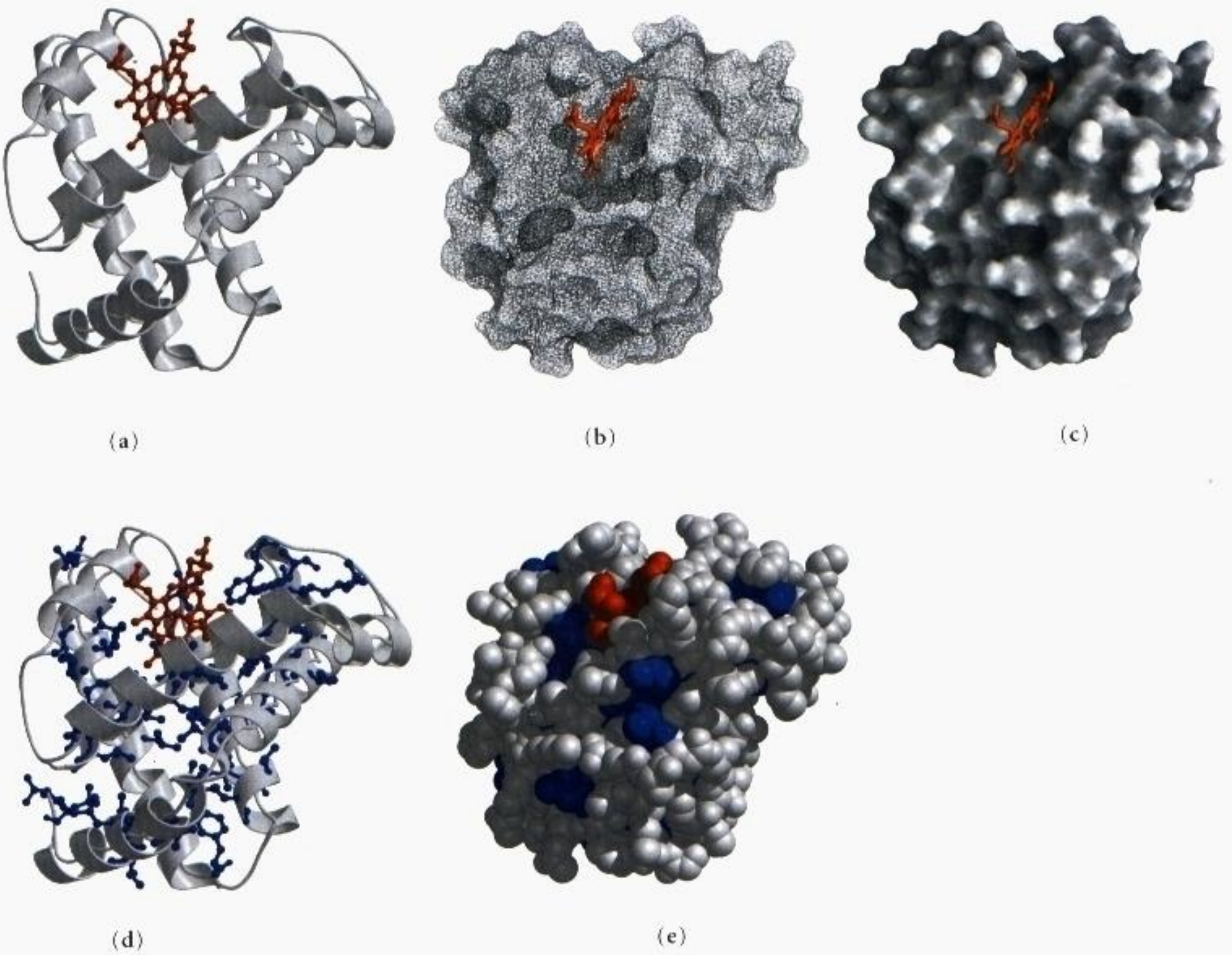
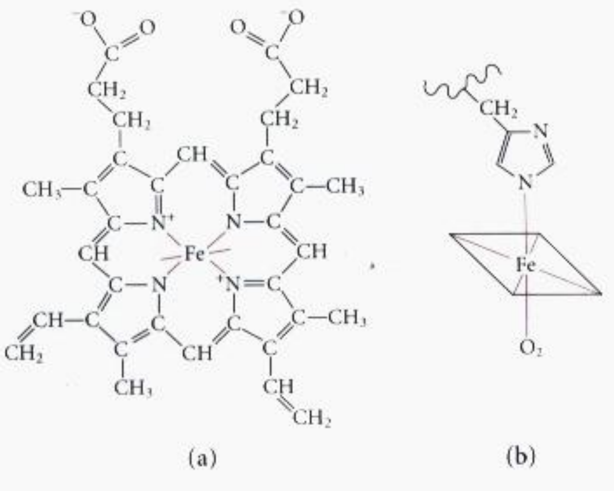


Figura 6-16 – A estrutura terciária da mioglobina de espermacete. A orientação da proteína é semelhante em todas as visualizações; o grupo heme é mostrado em vermelho. Além de ilustrar a molécula de mioglobina, esta figura apresenta exemplos de maneiras diferentes de se mostrar uma estrutura protéica. (**a**) Estrutura polipeptídica, mostrada como uma representação em fita, representação essa que foi introduzida por Jane Richardson e que salienta as regiões de estrutura secundária. As regiões α-helicoidais são evidentes. (**b**) Uma imagem em retículas, enfatizando a superfície protéica. (**c**) Uma imagem de contorno de superfície útil para visualizar bolsões na proteína onde outras moléculas poderiam se ligar. (**d**) Uma representação em fita, incluindo cadeias laterais (em azul) para os resíduos hidrofóbicos Leu, Ile, Val e Phe. (**e**) Um modelo espaço-cheio com todas as cadeias laterais dos aminoácidos. Cada átomo é representado por uma esfera que abrange o seu raio de van der Waals. Os resíduos hidrofóbicos são novamente mostrados em azul; a maior parte não é visível porque está localizada no interior da proteína.

Figura 6-17 – O grupo heme. Este grupo está presente na mioglobina, na hemoglobina, nos citocromos e em muitas outras proteínas heme. (**a**) O heme consiste de uma estrutura orgânica cíclica, a protoporfirina, à qual um átomo de ferro se liga em seu estado ferroso (Fe^{2+}). O átomo de ferro possui seis ligações por coordenação, quatro no plano da protoporfirina à qual estão ligadas e duas perpendiculares a ela. (**b**) Na mioglobina e na hemoglobina, uma das ligações por coordenação perpendiculares está ligada ao átomo de nitrogênio de um resíduo de His. A outra é "aberta" e serve como sítio de ligação para uma molécula de O_2.



Adendo 6-3

Métodos para a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína

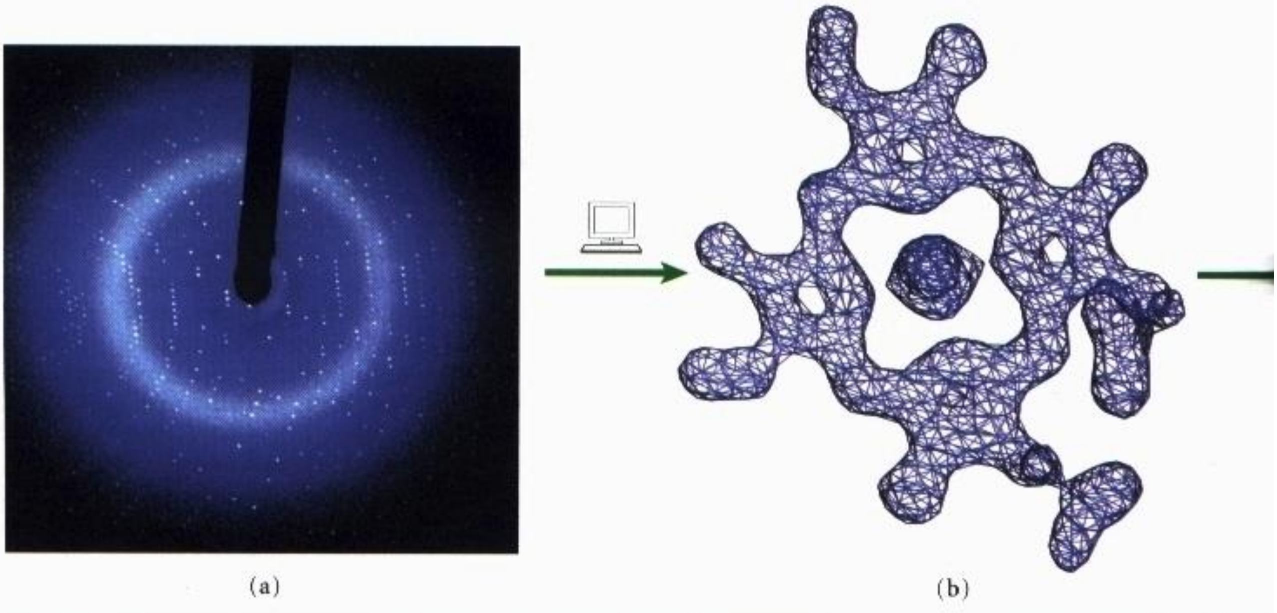
Difração de raios X

O espaçamento dos átomos em uma grade cristalina pode ser determinado pelas medidas de localização e intensidades das manchas produzidas em filme fotográfico por um feixe de raios X de um determinado comprimento de onda, após este ser difratado pelos elétrons dos átomos. Por exemplo, a análise por raios X dos cristais de cloreto de sódio mostra que os íons Na^+ e Cl^- estão dispostos em uma grade cúbica simples. O espaçamento dos diferentes tipos de átomos em moléculas orgânicas complexas, mesmo as de tamanho muito grande como as proteínas, pode ser também analisado por métodos de difração de raios X, embora de forma bem mais trabalhosa do que para os cristais salinos simples. Quando o padrão repetitivo em um cristal é uma molécula tão grande como uma proteína, os numerosos átomos da molécula geram milhares de padrões de difração que devem ser analisados por computadores.

O processo pode ser entendido em um nível elementar, considerando-se que as imagens são geradas em um microscópio óptico. A luz de uma fonte pontual é focalizada sobre um objeto. As ondas de luz são espalhadas pelo objeto e, em seguida, recombinadas por uma série de lentes, a fim de gerar a imagem ampliada do objeto. O menor objeto cuja estrutura pode ser determinada por esse sistema (isto é, o poder de resolução do microscópio) é determinado pelo comprimento de onda da luz — nesse caso, a luz visível, com comprimentos na faixa de 400 a 700nm. Objetos menores do que a metade do comprimento de onda da luz incidente não podem ser resolvidos. Para resolver objetos tão pequenos quanto uma proteína, devem-se utilizar raios X, cujos comprimentos de onda se situam na faixa de 0,7 a 1,5Å (0,07 a 0,15nm). Entretanto, não existem lentes que possam recombinar os raios X para formar uma imagem; por isso, o padrão dos raios X difratados é diretamente recolhido e uma imagem é reconstruída por técnicas matemáticas.

A quantidade de informação obtida a partir da cristalografia de raios X depende do grau de ordem estrutural da amostra. Alguns parâmetros estruturais importantes foram obtidos de estudos iniciais dos padrões de difração das proteínas fibrosas dispostas em arranjos regulares, como no cabelo e na lã. Entretanto, os empacotamentos ordenados formados por proteínas fibrosas não são cristais — as moléculas estão alinhadas lado a lado, mas nem todas estão orientadas na mesma direção. Informações mais detalhadas sobre a estrutura tridimensional das proteínas requerem cristais altamente ordenados. A cristalização de proteínas é uma ciência um tanto empírica, e as estruturas de muitas proteínas importantes não são ainda conhecidas simplesmente porque elas se mostraram de difícil cristalização. Os especialistas nessa técnica compararam a obtenção de cristais de proteínas a manter juntas bolas de boliche com fita de celofane.

Operacionalmente, há várias etapas em uma análise estrutural por raios X (Fig. 1). Tendo sido obtido um cristal, este é colocado perante um feixe de raios X entre a fonte dos raios e um detetor, de modo a gerar um arranjo regular de manchas denominadas reflexões. As manchas são criadas pelo feixe de raios difratado, e cada átomo em uma molécula contribui para cada mancha. Um mapa de densidade eletrônica da proteína é reconstituído a partir do padrão global de difração utilizando-se uma técnica matemática denominada transformada de Fourier. Assim, um computador atua como uma "lente computacional". Um modelo da estrutura consistente com o mapa de densidade eletrônica é então obtido.


(a)

(b)

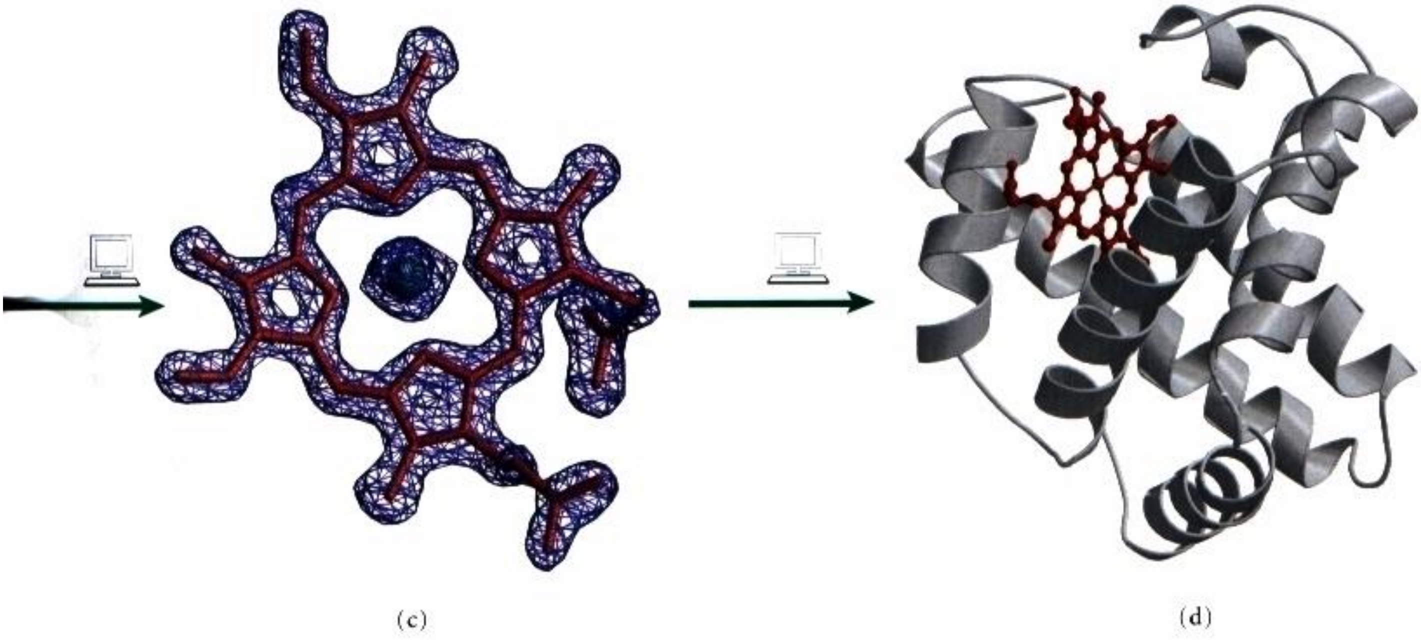
John Kendrew verificou que o padrão de difração de raios X da mioglobina cristalina (isolada de músculos de espermacete) é bastante complexo, com cerca de 25.000 reflexões. A análise computacional dessas reflexões foi feita por partes. A resolução foi melhorada em cada estágio, até que em 1959 as posições de todos os átomos distintos de hidrogênio foram determinadas. A seqüência de aminoácidos da proteína obtida por análise química era consistente com o modelo molecular. As estruturas de milhares de proteínas, muitas das quais bem mais complexas do que a mioglobina, foram determinadas com um grau de resolução semelhante.

O ambiente físico no interior de um cristal não é idêntico ao de uma solução ou uma célula viva. Um cristal impõe uma média espacial e temporal na estrutura, deduzida a partir de sua análise, e os estudos de difração de raios X fornecem poucas informações sobre a movimentação molecular de uma proteína. A conformação das proteínas em um cristal pode ser também afetada, a princípio, por fatores não fisiológicos tais como contatos incidentais entre proteínas dentro do cristal. Entretanto, quando estruturas derivadas da análise dos cristais foram comparadas com informações estruturais obtidas por outras técnicas (como RMN, descrita a seguir), a estrutura obtida a partir dos cristais quase sempre representa uma conformação funcional da proteína. A cristalografia de raios X pode ser aplicada com sucesso a proteínas muito grandes para poderem ser analisadas por RMN.

Ressonância magnética nuclear

Um importante método complementar para a determinação de estruturas tridimensionais de macromoléculas é a ressonância magnética nuclear (RMN). As técnicas modernas de RMN são usadas para determinar as estruturas de grandes macromoléculas, incluindo carboidratos, ácidos nucléicos e proteínas de tamanho pequeno a médio. Uma vantagem dos estudos com RMN é o fato de serem realizados com as macromoléculas em solução, enquanto a cristalografia por raios X se limita a macromoléculas que possam ser cristalizadas. A RMN pode também trazer à luz o aspecto dinâmico da estrutura protéica, incluindo alterações conformacionais, enovelamento protéico e interações com outras moléculas.

Figura 1 – Etapas na determinação da estrutura da mioglobina do espermacete por cristalografia de raios X. (**a**) Os padrões de difração de raios X são gerados a partir de um cristal da proteína. (**b**) Os dados extraídos dos padrões de difração são usados para calcular um mapa de densidade eletrônica tridimensional da proteína. A densidade eletrônica de uma parte da estrutura, o heme, é mostrada. (**c**) As regiões de maior densidade eletrônica revelam a localização dos núcleos atômicos e essa informação é utilizada para montar a estrutura final. Aqui, a estrutura do heme é modelada em seu mapa de densidade eletrônica. (**d**) Estrutura completa da mioglobina de espermacete, incluindo o heme.



Continua na página seguinte

A RMN é uma manifestação do momento angular do spin nuclear, uma propriedade da mecânica quântica dos núcleos atômicos. Apenas certos átomos, incluindo ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F e ^{31}P, possuem o tipo de spin nuclear capaz de produzir um sinal de RMN. O spin nuclear gera um dipolo magnético. Quando um campo magnético estático intenso é aplicado a uma solução que contém um único tipo de macromolécula, os dipolos magnéticos alinham-se em presença do campo em uma das duas possíveis orientações, paralela (de baixa energia) ou antiparalela (de alta energia). Um breve (~10μs) pulso de energia eletromagnética de freqüência adequada (a freqüência ressonante, que está na faixa das freqüências de rádio) é aplicado com ângulos adequados em relação aos núcleos alinhados no campo magnético. Alguma energia é absorvida quando os núcleos passam para o estado de maior energia, e o espectro de absorção resultante contém informação sobre a identidade do núcleo e o ambiente químico imediato. Os dados de diversos experimentos executados sobre uma amostra são tratados, a fim de se obterem valores médios, aumentando-se a razão sinal/ruído, e um espectro de RMN como o da Figura 2 é obtido.

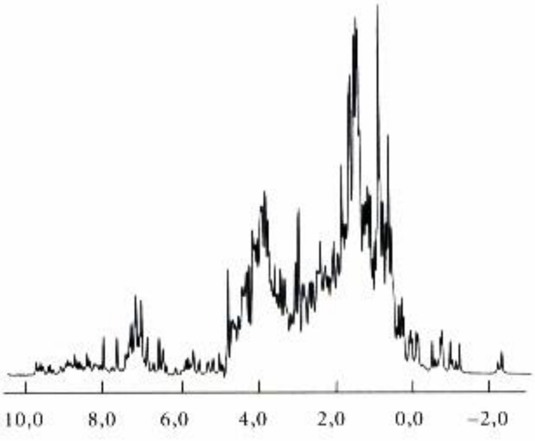


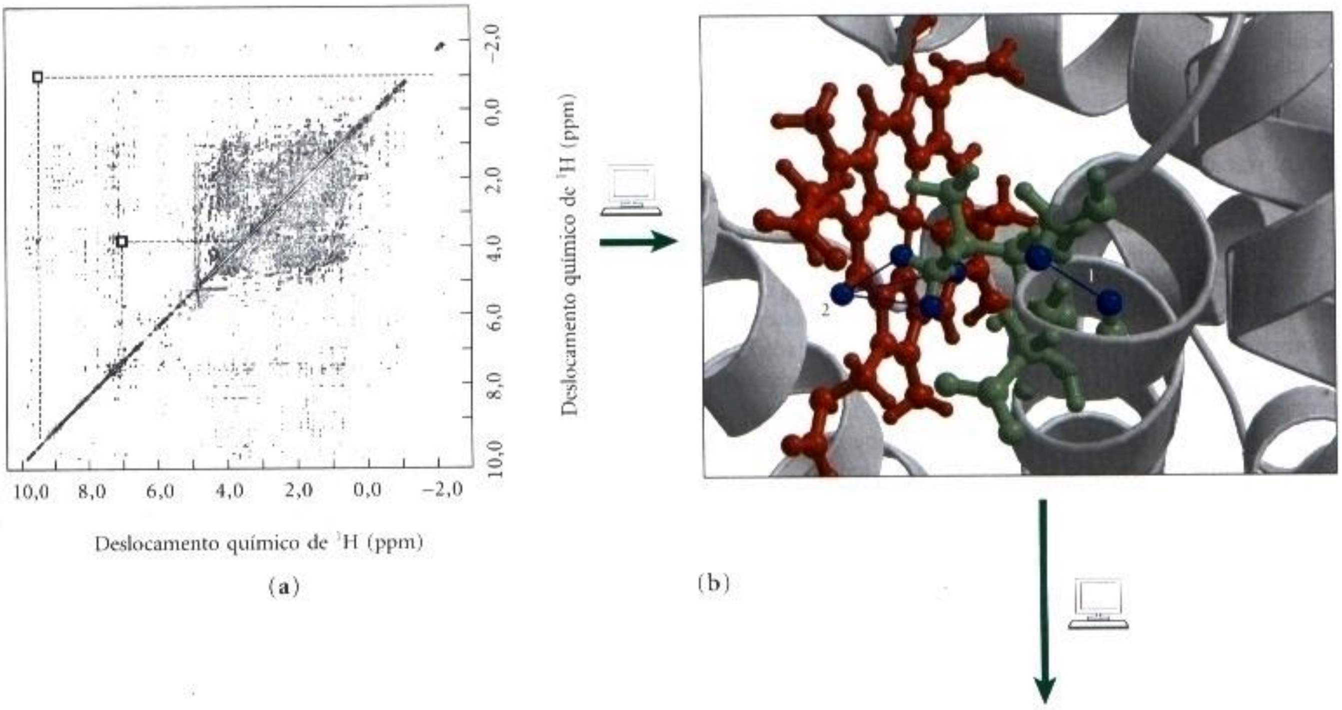
Figura 2 – O espectro unidimensional de uma globina do sangue de um verme marinho. Essa proteína e a mioglobina de espermacete são análogos estruturais muito próximos, pertencendo à mesma família estrutural de proteínas e compartilhando uma função transportadora de oxigênio.

^{1}H é particularmente importante para os experimentos de RMN devido à sua alta sensibilidade e abundância natural. Para as macromoléculas, os espectros de ^{1}H podem ser bastante complexos. Mesmo uma pequena proteína possui centenas de átomos de ^{1}H, resultando tipicamente em um espectro de RMN unidimensional muito complexo para ser analisado. A análise estrutural tornou-se possível com o advento das técnicas de RMN bidimensionais (Fig. 3). Esses métodos permitem medidas de acoplamentos dependentes da distância dos spins nucleares em átomos próximos espacialmente (o efeito nuclear Overhauser — NOE —, em um método duplicado — NOESY — ou o acoplamento de spins nucleares em átomos conectados por ligações covalentes — espectroscopia de correlação total, ou TOCSY).

Traduzir um espectro bidimensional de RMN em uma estrutura tridimensional completa pode ser um processo trabalhoso. Os sinais NOE fornecem alguma informação sobre as distâncias entre átomos individuais, mas para que essas distâncias possam ser úteis, os átomos que originam cada sinal devem ser identificados. Experimentos TOCSY complementares podem ajudar a identificar quais sinais NOE são gerados por átomos unidos por ligações covalentes. Certos padrões de sinais NOE foram associados com estruturas secundárias, como as α-hélices. Técnicas modernas de engenharia genética (Capítulo 29) podem ser usadas para preparar proteínas que contêm os isótopos raros ^{13}C e ^{15}N. Os novos sinais de RMN produzidos por esses átomos e o acoplamento com os sinais de ^{1}H resultantes dessas substituições auxiliam nas determinações dos sinais NOE de ^{1}H. O processo é também auxiliado pelo conhecimento da seqüência de aminoácidos do polipeptídeo.

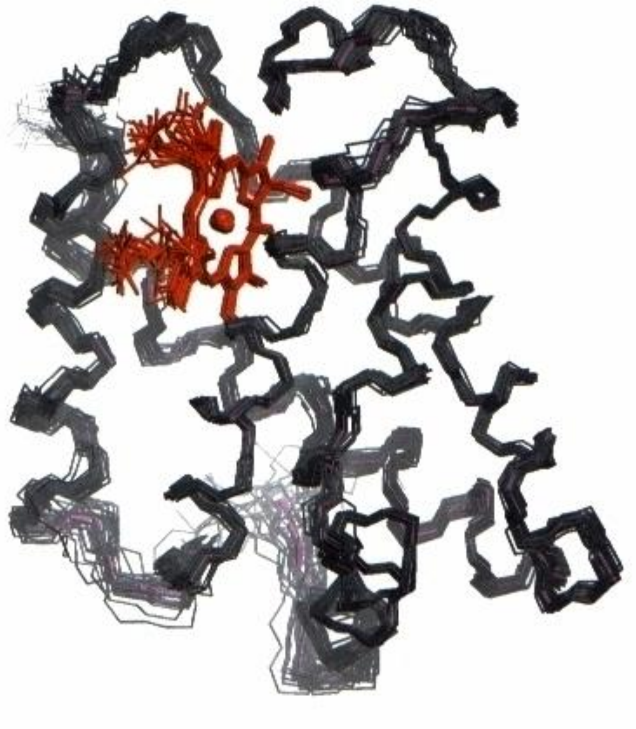
Para gerar uma estrutura tridimensional, os parâmetros de distância são introduzidos em um computador, juntamente com parâmetros geométricos, como quiralidade, raios de van der Waals, e comprimentos e ângulos de ligações. O computador gera uma família de estruturas proximamente relacionadas que representam a faixa de conformações consistentes com os parâmetros de distâncias do NOE (Fig. 3c). A incerteza nas estruturas geradas pela RMN é, em parte, um reflexo das vibrações moleculares (oscilações) no interior da estrutura protéica em solução, discutida com mais detalhes no Capítulo 7. A incerteza experimental natural também tem o seu papel nisso.

Quando uma estrutura protéica é determinada tanto por cristalografia de raios X como por RMN, as estruturas obtidas geralmente são bem concordantes entre si. Em alguns casos, as localizações precisas das cadeias laterais de aminoácidos do exterior das proteínas são diferentes devido aos efeitos do empacotamento de moléculas protéicas adjacentes em um cristal. As duas técnicas juntas estão no âmago do rápido aumento na disponibilidade de informações estruturais sobre as macromoléculas nas células vivas.



(a)

(b)



(c)

Figura 3 – O uso do RMN bidimensional na geração da estrutura tridimensional de uma globina, a mesma proteína usada para gerar os dados da Figura 2. A diagonal em um espectro bidimensional equivale a um espectro unidimensional. Os picos externos à diagonal são sinais NOE gerados pelas interações de curta distância entre átomos de ^{1}H que podem gerar sinais bem distantes no espectro unidimensional. Duas dessas interações são identificadas em (**a**) e suas identidades são mostradas com linhas azuis em (**b**). Três linhas são traçadas para a interação 2 entre um grupo metila na proteína e um hidrogênio no heme. O grupo metila gira rapidamente de modo que seus três hidrogênios contribuem igualmente para a interação e o sinal de RMN. Essa informação é usada para determinar a estrutura tridimensional completa, como mostrado em (**c**). As linhas múltiplas mostradas para a estrutura protéica representam a família de estruturas consistente com os parâmetros de distância nos dados de RMN. A similaridade estrutural com a hemoglobina (veja Fig. 1) é evidente. As proteínas estão orientadas da mesma maneira em ambas as figuras.

As proteínas globulares apresentam diversas estruturas terciárias

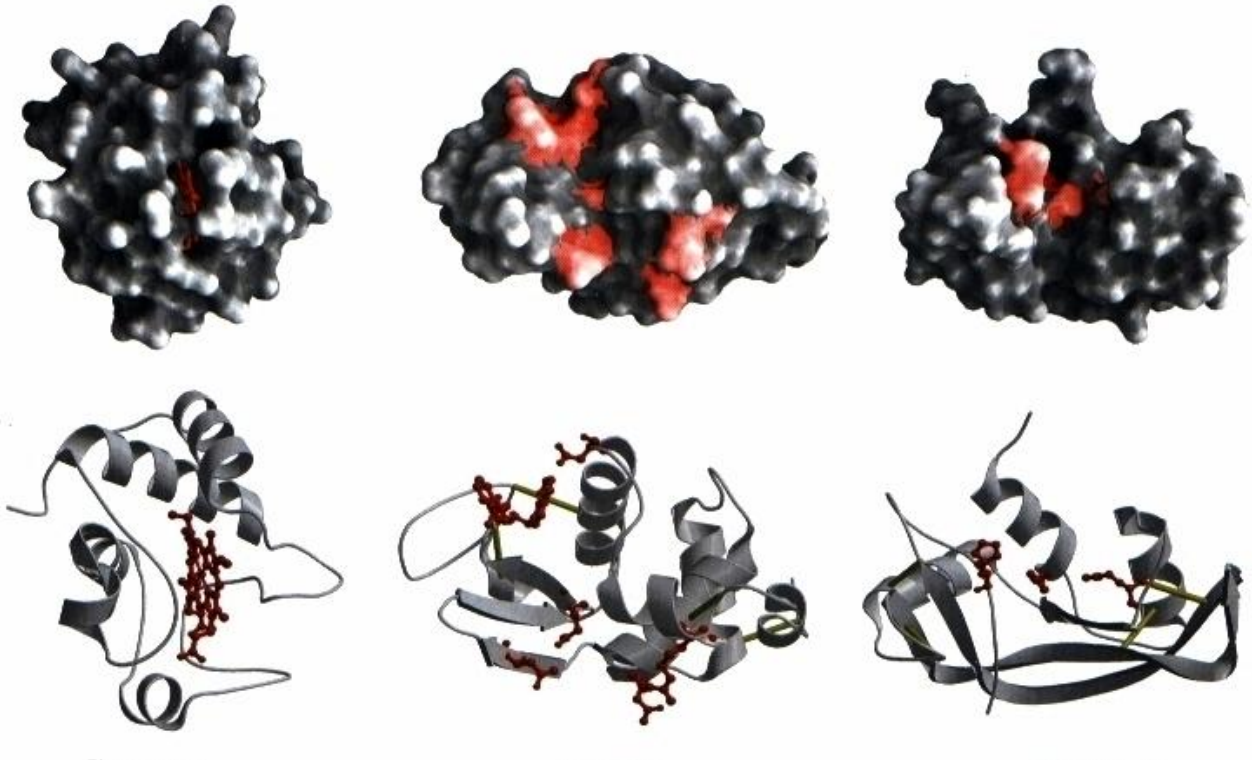
Com a elucidação das estruturas terciárias de centenas de outras proteínas globulares por análises com raios X, tornou-se claro que a mioglobina representa apenas uma das diferentes formas pelas quais uma cadeia polipeptídica pode enovelar-se. Na Figura 6-18 as estruturas do citocromo *c*, lisozima e ribonuclease são comparadas. Todas apresentam diferentes seqüências de aminoácidos e diferentes estruturas terciárias, refletindo diferenças nas suas funções. Todas são relativamente pequenas e fáceis de manipular, facilitando as análises estruturais. O citocromo *c* é um componente da cadeia respiratória das mitocôndrias (Capítulo 19). Como a mioglobina, o citocromo *c* é uma proteína heme. Apresenta uma única cadeia polipeptídica de cerca de 100 resíduos (M_r 12.400) e um único grupo heme. Nesse caso, a protoporfirina do grupo heme está covalentemente ligada ao polipeptídeo. Apenas cerca de 40% do polipeptídeo é formado por segmentos α-helicoidais, comparados com os 70% da cadeia de mioglobina. O restante da cadeia do citocromo *c* contém dobras β e segmentos irregularmente enovelados e estendidos.

A lisozima (M_r 14.600) é uma enzima abundante na clara do ovo e nas lágrimas humanas que catalisa a clivagem hidrolítica de polissacarídeos das paredes celulares protetoras de algumas famílias de bactérias, atuando, portanto, como um agente bactericida. Da mesma forma que no citocromo *c*, cerca de 40% de seus 129 resíduos de aminoácidos estão em segmentos α-helicoidais, mas com diferentes arranjos, incluindo algumas estruturas em folhas β (Fig. 6-18). Quatro ligações dissulfeto fornecem estabilidade a essa estrutura. As α-hélices formam uma extensa cavidade na lateral da molécula, denominada sítio ativo, que é o sítio de ligação do substrato e da catálise. O polissacarídeo bacteriano que é o substrato para a lisozima se ajusta a essa cavidade.

A ribonuclease, outra pequena proteína globular (M_r 13.700), é uma enzima secretada pelo pâncreas no interior do intestino delgado, onde catalisa a hidrólise de certas ligações nos ácidos ribonucléicos presentes no alimento ingerido. Sua estrutura terciária, determinada por análises de raios X, mostra que apenas uma pequena parte de sua cadeia polipeptídica de 124 resíduos de aminoácidos se apresenta na conformação α-helicoidal, mas apresenta muitos segmentos em conformação β (Fig. 6-18). Como a lisozima, a ribonuclease apresenta quatro ligações dissulfeto entre porções da cadeia polipeptídica.

Em proteínas pequenas, os resíduos hidrofóbicos apresentam menor probabilidade de estarem protegidos em um interior hidrofóbico — princípios básicos de geometria determinam que quanto menor a proteína, menor será a razão entre o volume e a área superficial. As proteínas menores também possuem um menor número de interações fracas possíveis que possam estabilizá-las. Isso explica por que muitas proteínas pequenas como as da Figura 6-18 são estabilizadas por algumas ligações covalentes. A lisozima e a ribonuclease, por exemplo, possuem ligações dissulfeto, e o grupo heme do citocromo *c* é ligado covalentemente à proteína por dois lados, o que fornece estabilização significativa de toda a estrutura protéica.

A Tabela 6-2 mostra as proporções de α-hélice e conformação β (expressas como porcentagens de resíduos em cada estrutura secundária) em diversas proteínas globulares pequenas de cadeia simples. Cada uma dessas proteínas possui uma estrutura distinta, adaptada para a sua função biológica particular, mas,



Citocromo *c* Lisozima Ribonuclease

Figura 6-18 – Estruturas tridimensionais de algumas proteínas de pequeno tamanho. Aqui são mostrados o citocromo c, a lisozima e a ribonuclease. Os grupos funcionais importantes (o heme no citocromo c, as cadeias laterais dos aminoácidos no sítio ativo da lisozima e na ribonuclease) são mostrados em vermelho. As ligações dissulfeto estão em amarelo. Cada proteína é mostrada em contorno de superfície e em uma representação em fita, na mesma orientação. Nas representações em fita, as regiões em conformação β são representadas por setas planares e as α-hélices por fitas espiraladas.

Tabela 6-2 – Porcentagens aproximadas de α-hélices e conformações β em algumas proteínas de cadeia simples*

Proteína (resíduos totais)	Resíduos (%)	
	α-hélice	Conformação β
Quimotripsina (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxipeptidase (307)	38	17
Citocromo c (104)	39	0
Lisozima (129)	40	12
Mioglobina (153)	78	0

Fonte: Dados de Cantor CR & Schimmel PR. (1980) *Biophysical Chemistry*, Part 1: *The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, WH Freeman and Company, New York.

*Porções das cadeias polipeptídicas que não estão nas conformações de α-hélice e conformação β consistem de dobras e enovelamentos ou estiramentos irregulares. Segmentos de α-hélices e conformações β, às vezes, desviam-se ligeiramente de suas geometrias e dimensões normais.

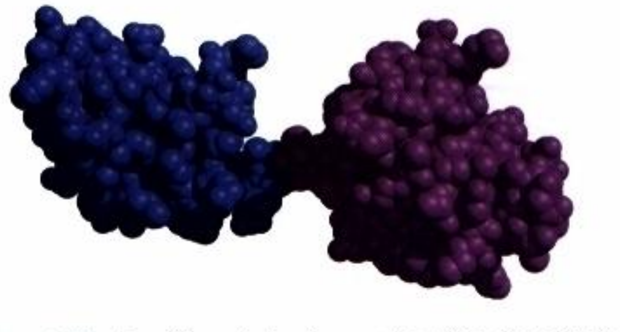


Figura 6-19 – Domínios estruturais no polipeptídeo troponina C. Esta proteína ligadora de cálcio, associada com o tecido muscular, apresenta domínios ligantes de cálcio separados, indicados em azul e púrpura.

em conjunto, elas apresentam várias propriedades comuns. Cada uma delas é enovelada de forma compacta e as cadeias laterais dos aminoácidos hidrofóbicos estão orientadas para o interior das moléculas (afastadas da água), enquanto as cadeias laterais hidrofílicas se situam na superfície. As estruturas são estabilizadas por uma grande quantidade de ligações de hidrogênio e algumas interações fracas.

A análise de muitas proteínas globulares revela padrões estruturais comuns

Para o estudante novato, as estruturas terciárias extremamente complexas das proteínas globulares muito maiores do que as mostradas na Figura 6-18 são mais bem entendidas quando se atenta para os padrões estruturais que surgem em proteínas distintas e freqüentemente não relacionadas entre si. A estrutura tridimensional de uma proteína globular típica pode ser considerada como uma montagem de segmentos polipeptídicos nas conformações de α-hélice e folhas β, unidos por segmentos ligantes. A estrutura pode então ser descrita, em uma primeira aproximação, pelas definições de como esses segmentos polipeptídicos se ordenam e como os segmentos ligantes são dispostos. Esse formalismo levou a desenvolvimentos de bancos de dados que permitem comparações informativas relativas às estruturas protéicas, complementando outros bancos de dados que permitem comparações de seqüências protéicas.

Uma compreensão de uma estrutura tridimensional completa é obtida a partir da análise de suas partes. Iniciaremos definindo os termos utilizados para descrever as subestruturas protéicas para passarmos, então, às regras de enovelamento elucidadas pela análise das estruturas de diversas proteínas.

Estruturas supersecundárias, também denominadas **motivos** ("motifs") ou simplesmente **dobras** ("folds"), são arranjos particularmente estáveis de diversos elementos de estrutura secundária e das conexões entre eles. Não há uma concordância generalizada entre os bioquímicos sobre a aplicação dos três termos e eles são freqüentemente utilizados indistintamente. Os termos são também aplicados a uma ampla gama de estruturas. Os motivos podem variar de simples a complexos, aparecendo algumas vezes em unidades repetitivas ou combinações. Um motivo de grande tamanho pode compreender uma proteína inteira. Já nos defrontamos com um motivo bem estudado, o superenovelamento da α-queratina, encontrado também em várias outras proteínas.

Os polipeptídeos que apresentam mais de algumas centenas de resíduos de aminoácidos freqüentemente se dobram em duas ou mais unidades globulares estáveis denominadas **domínios**. Em muitos casos, um domínio de uma grande proteína irá reter sua estrutura tridimensional correta até mesmo quando separada (por exemplo, por clivagem proteolítica) do restante da cadeia polipeptídica. Uma proteína com domínios múltiplos pode ter um lóbulo globular distinto para cada domínio (Fig. 6-19), mas, mais comumente, os contatos extensos entre os domínios os tornam de difícil identificação. Diferentes domínios apresentam, com freqüência, funções distintas, tais como a ligação de pequenas moléculas ou interação com outras proteínas. As pequenas proteínas possuem, geralmente, apenas um domínio (o domínio *é* a proteína).

O enovelamento de polipeptídeos está sujeito a um conjunto de regras físicas e químicas. Uma amostra das principais regras de enovelamento que surgiram nos fornece uma oportunidade para introduzir alguns motivos simples.

1. As interações hidrofóbicas contribuem bastante para a estabilidade das estruturas protéicas. Ocultar os grupos R de aminoácidos hidrofóbicos de modo a excluir a água requer pelo menos duas camadas de estrutura secundária. Dois motivos simples, o **laço β-α-β** ("β-α-β loop") e a **quilha α-α** ("α-α corner") (Fig. 6-20a) criam duas camadas.

2. Onde quer que apareçam nas proteínas, α-hélices e conformações β geralmente se encontram em diferentes camadas estruturais. Isso ocorre porque a estrutura de um segmento polipeptídico na conformação β (Fig. 6-7) geralmente não pode fazer ligações de hidrogênio facilmente com uma α-hélice alinhada com ela.

3. Os segmentos polipeptídicos adjacentes em uma seqüência primária são geralmente arranjados entre si de forma adjacente na estrutura enovelada. Apesar de segmentos distantes de um polipeptídeo poderem aparecer juntos na estrutura terciária, isso não é a regra geral.

4. As conexões entre os elementos da estrutura secundária não podem se cruzar ou formar nós (Fig. 6-20b).

5. A conformação β é mais estável quando os segmentos individuais estão ligeiramente dobrados em um sentido orientado para a direita. Isso influencia tanto o arranjo das folhas β entre si como o percurso da conexão polipeptídica entre elas. Duas folhas β paralelas, por exemplo, devem estar conectadas por uma cadeia cruzada (Fig. 6-20c). A princípio, esse cruzamento deve ter uma conformação orientada para a direita ou para a esquerda, mas nas proteínas ela é quase sempre orientada para a direita. As conexões para a direita tendem a ser mais curtas do que as conexões para a esquerda, além de se dobrarem em ângulos menores, tornando-se de mais fácil formação. O dobramento das

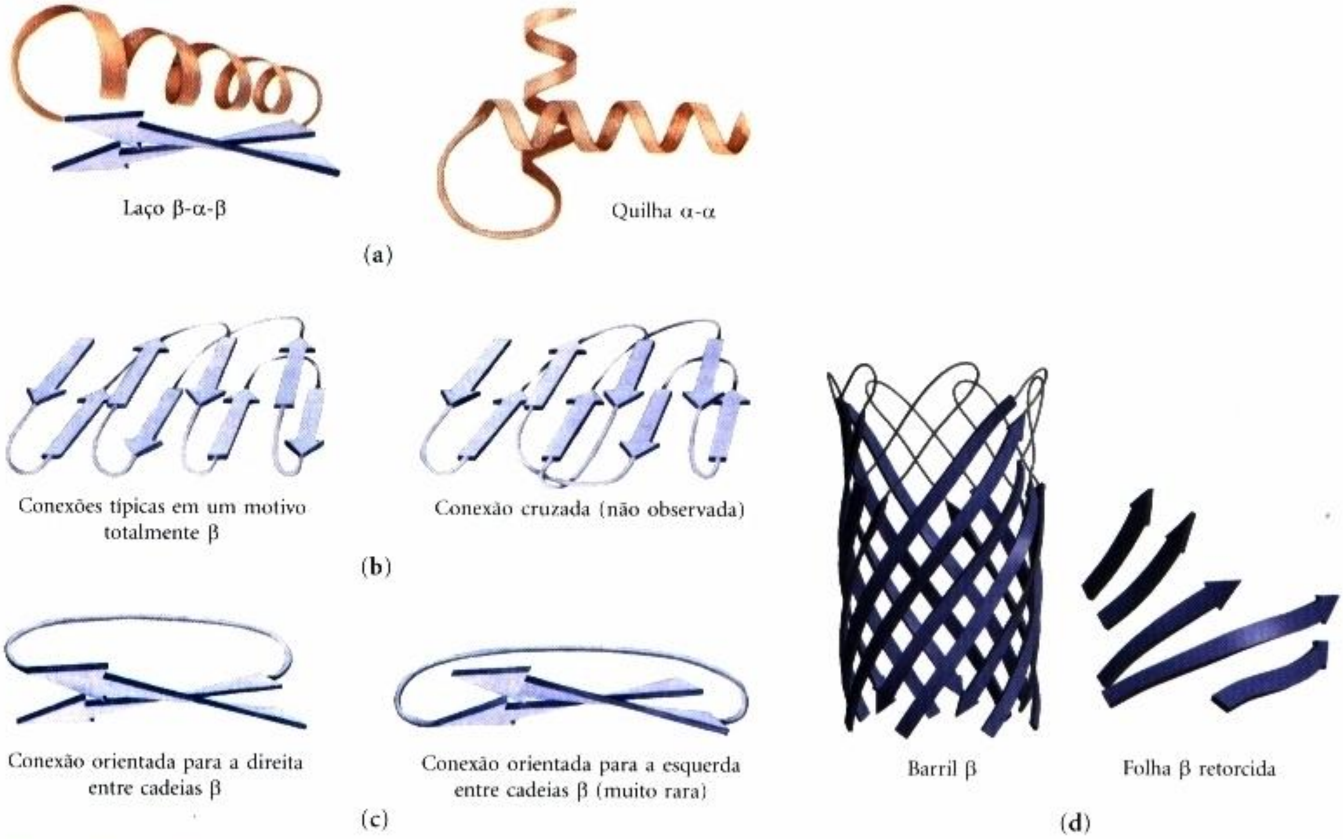

Laço β-α-β
Quilha α-α
(a)
Conexões típicas em um motivo totalmente β
Conexão cruzada (não observada)
(b)
Conexão orientada para a direita entre cadeias β
Conexão orientada para a esquerda entre cadeias β (muito rara)
(c)
Barril β
Folha β retorcida
(d)

Figura 6-20 – Padrões estáveis de enovelamento em proteínas. (**a**) Dois motivos simples e comuns que fornecem duas camadas de estrutura secundária. As cadeias laterais de aminoácidos na interface entre elementos da estrutura secundária são protegidas da água. Observe que as folhas β no laço β-α-β tendem a se dobrar orientadas para a direita. (**b**) As conexões entre as folhas β em camadas de folhas β. As cadeias são mostradas a partir de uma extremidade sem nenhum enovelamento incluído no esquema. As conexões mais largas são as das extremidades mais próximas do ponto de visualização; as estreitas estão nas extremidades mais distantes das cadeias β. As conexões em uma dada extremidade (por exemplo, próximas do ponto de visualização) não se cruzam umas com as outras. (**c**) Devido ao enovelamento das cadeias β, as conexões entre as cadeias são geralmente orientadas para a direita. Conexões orientadas para a esquerda necessitam maiores ângulos e são mais difíceis de se formar. (**d**) Dois arranjos de cadeias β estabilizadas pela tendência das cadeias para se enovelarem. Esse barril β é um domínio único de α-hemolisina da bactéria *Staphylococcus aureus*. A folha β retorcida pertence a um domínio da fotoliase de *E. coli*.

folhas β também leva a um dobramento característico da estrutura formada, quando muitos segmentos são unidos entre si. Dois exemplos de estruturas resultantes são os barris β e as folhas β enoveladas (Fig. 6-20d), que formam o núcleo de muitas estruturas maiores.

Seguindo essas regras, motivos complexos podem ser formados de outros mais simples. Por exemplo, uma série de laços β-α-β, dispostos de modo que as folhas β formem um barril, cria um motivo particularmente estável e comum denominado **barril α/β** (Fig. 6-21). Nessa estrutura, cada segmento β paralelo é unido a seu vizinho por um segmento α-helicoidal. Todas as conexões são orientadas para a direita. O barril α/β é encontrado em muitas enzimas, com freqüência apresentando um sítio de ligação para um co-fator ou substrato na forma de um bolsão próximo a uma das extremidades do barril. Observe que os domínios que exibem padrões de enovelamento semelhantes são ditos terem um mesmo motivo mesmo quando suas α-hélices e folhas β constituintes possam diferir no comprimento.

Os motivos das proteínas formam a base para a classificação estrutural das proteínas

Como vimos, a complexidade das estruturas terciárias diminui quando levamos em conta as subestruturas. Levando essa idéia adiante, pesquisadores organizaram bancos de dados estruturais de acordo com os níveis hierárquicos de estruturas. A Classificação Estrutural de Proteínas ("Structural Classification of Proteins", SCOP) oferece um bom exemplo dessa tendência muito importante em bioquímica. No nível mais alto de classificação, o banco de dados SCOP toma emprestado um esquema de uso comum, pelo qual as proteínas são divididas em quatro classes: toda α, toda β, α/β (na qual os segmentos α e β são intercalados ou alternados) e α + β (na qual as regiões α e β estão um tanto segregadas) (Fig. 6-22, págs. 146-147).

Em cada classe existem de dezenas a centenas de diferentes possibilidades de enovelamento, formadas por subestruturas cada vez mais identificáveis. Algumas dessas subestruturas são muito comuns, outras foram encontradas em apenas uma proteína. A Figura 6-22 apresenta diversos motivos escolhidos entre as quatro classes de estruturas protéicas. Eles somam apenas uma pequena amostra, entre as centenas de motivos conhecidos. O número de padrões de enovelamento não é, no entanto, infinito. À medida que novas estruturas protéicas foram sendo identificadas, a fração dessas estruturas que continham um novo motivo foi continuamente diminuindo. Menos de 1.000 diferentes enovelamentos ou motivos devem existir em todas as proteínas. A Figura 6-22 também mostra como proteínas reais podem se organizar com base na presença dos motivos anteriormente discutidos. Os dois níveis superiores, **classe** e **enovelamento**, são puramente estruturais. Abaixo desses níveis, a classificação baseia-se em relações evolutivas.

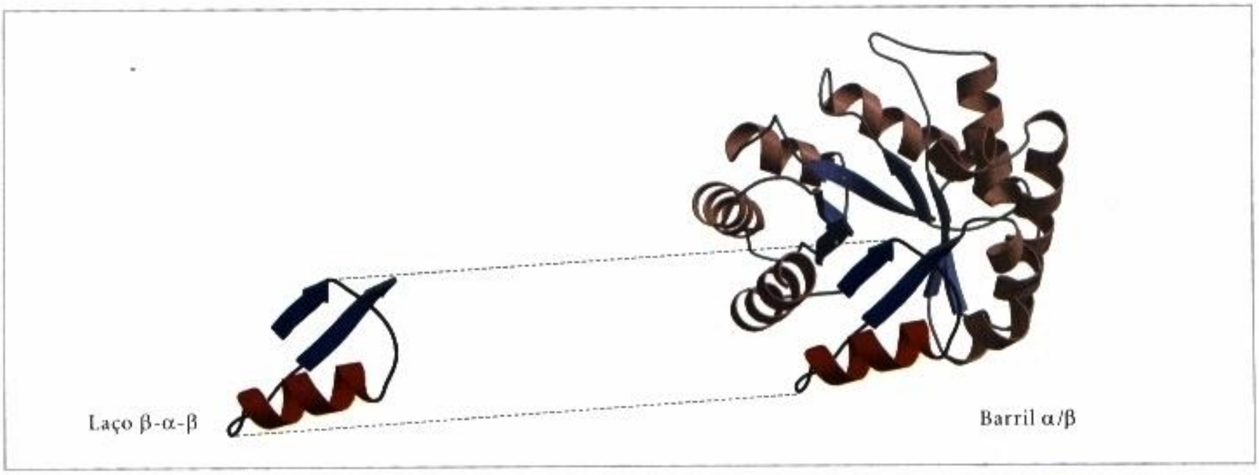


Figura 6-21 – Construindo grandes motivos a partir de outros menores. O barril α/β é um motivo comum construído a partir de repetições de um motivo mais simples, o laço β-α-β. Esse barril α/β é um domínio da enzima piruvato quinase de coelho.

As proteínas com similaridade de seqüências primárias significativas e/ou com estruturas e funções que se pode demonstrar serem semelhantes pertencem a uma mesma **família**. Uma forte relação evolutiva geralmente é evidente em uma família protéica. Por exemplo, a família da globina possui muitas proteínas diferentes com similaridade estrutural e de seqüência com a mioglobina (conforme visto nas proteínas usadas como exemplo no Adendo 6-3 e no capítulo seguinte).

Duas ou mais famílias com pequena similaridade de seqüência podem apresentar o mesmo motivo estrutural principal e similaridades funcionais; essas famílias são agrupadas como **superfamílias**. Uma relação evolutiva entre as famílias em uma superfamília é considerada provável, ainda que o tempo e as distinções funcionais, e portanto as diferentes pressões adaptativas, possam ter apagado relações de seqüência mais evidentes.

Os motivos estruturais tornam-se especialmente importantes na definição de famílias e superfamílias protéicas. A melhoria nos sistemas de classificação e comparação de proteínas leva inevitavelmente à elucidação de novas relações estruturais. Considerando-se o papel central das proteínas nos sistemas vivos, essas comparações estruturais podem ajudar a esclarecer diversos aspectos da bioquímica, desde a evolução de proteínas individuais até a história evolutiva de vias metabólicas inteiras.

Estruturas quaternárias de proteínas variam desde simples dímeros até grandes complexos

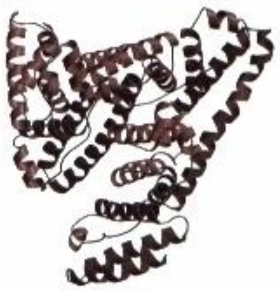
Muitas proteínas apresentam diversas subunidades polipeptídicas. A associação de cadeias polipeptídicas pode servir a diversas funções. Muitas proteínas multissubunitárias apresentam funções regulatórias; a ligação de pequenas moléculas pode afetar a interação entre as subunidades, provocando grandes alterações na atividade da proteína em resposta a pequenas mudanças na concentração de substrato ou de moléculas regulatórias (Capítulo 8). Em outros casos, subunidades separadas podem ter funções distintas mas relacionadas entre si, tais como a catálise e a regulação. Algumas associações, como as proteínas fibrosas vistas anteriormente neste capítulo e a capa protéica de vírus, atuam primariamente em funções estruturais. Alguns complexos protéicos muito grandes são sítios de reações complexas, que apresentam várias etapas. Um exemplo é o ribossomo, o sítio da síntese protéica, que incorpora dúzias de subunidades protéicas juntamente com diversas moléculas estruturais de RNA.

Uma proteína multissubunitária é também denominada **multímero**. Proteínas multiméricas podem ter de duas a centenas de subunidades. Um multímero com apenas algumas subunidades é freqüentemente denominado **oligômero**. Se um multímero for composto por diversas subunidades não-idênticas, a estrutura da proteína pode ser assimétrica e um tanto complicada. Entretanto, a maioria dos multímeros apresenta subunidades idênticas ou grupos repetitivos de subunidades não-idênticas, geralmente em arranjos simétricos. A unidade estrutural repetitiva de uma proteína multimérica, seja uma única subunidade ou um grupo de subunidades, é denominada **protômero**.

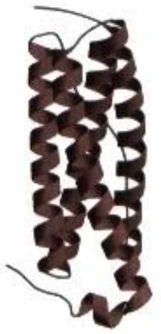
A primeira proteína oligomérica que teve a estrutura tridimensional determinada foi a hemoglobina (M_r 64.500) que contém quatro polipeptídeos e quatro grupos prostéticos heme, nos quais os átomos de ferro estão no estado ferroso (Fe^{2+}) (Fig. 6-17). A porção protéica, denominada globina, consiste de duas cadeias α (141 resíduos cada) e duas cadeias β (146 resíduos cada). Observe que, nesse caso, α e β não se referem a estruturas secundárias. Devido à hemoglobina ser quatro vezes maior do que a mioglobina, um esforço muito maior foi necessário para resolver sua estrutura tridimensional por análise de raios X, feito obtido por Max Perutz, John Kendrew e seus colaboradores em 1959. As subunidades da hemoglobina estão dispostas em pares simétricos (Fig. 6-23, p. 148), cada par apresentando uma subunidade α e uma subunidade β. Dessa forma, a hemoglobina pode ser descrita tanto como um tetrâmero quanto como um dímero de protômeros αβ.

Max Perutz (à esquerda)
John Kendrew, 1917-1997 (à direita)

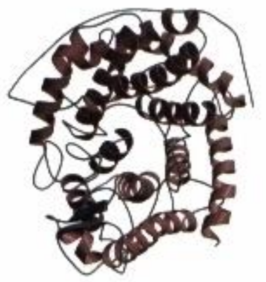
Toda α



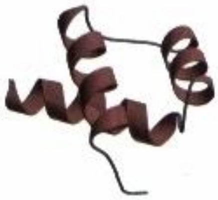
1ao6
Soroalbumina
Soroalbumina
Soroalbumina
Soroalbumina
Homem (*Homo sapiens*)



1bcf
Análogo da ferritina
Análogo da ferritina
Ferritina
Bacterioferritina (citocromo b_1)
Escherichia coli

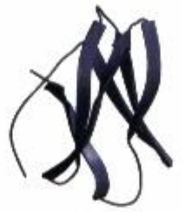


1gai
Toróide α/α
Glicosiltransferases de enovelamento super-helicoidal
Glicoamilase
Glicoamilase
Aspergillus awamori, variante x100

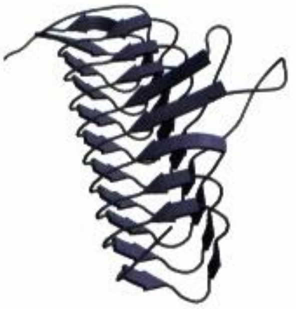


1enh
Feixe 3-helicoidal ligante de DNA
Análogo de homeodomínio
Homeodomínio
Homeodomínio em forma de cálice
Drosophila melanogaster

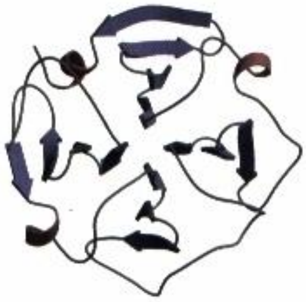
Toda β



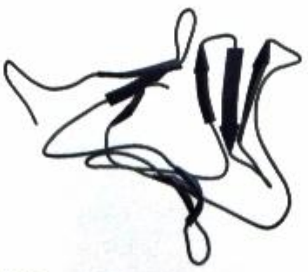
1hoe
Inibidor da α-amilase
Inibidor da α-amilase
Inibidor da α-amilase
HOE-467A
Streptomyces tendae 4158



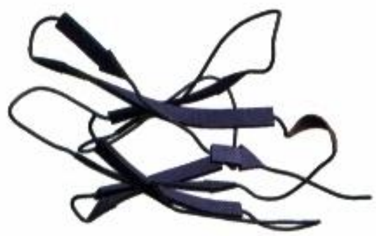
1lxa
β-hélice orientada para a esquerda de fita simples
Enzimas triméricas análogas a LpxA
UDP *N*-acetilglicosamina aciltransferase
UDP *N*-acetilglicosamina aciltransferase
Escherichia coli



1pex
Propulsor β de quatro lâminas
Domínio análogo à hemopexina
Domínio análogo à hemopexina
Colagenase-3 (MMP-13), domínio carboxiterminal
Homem (*Homo sapiens*)



1jpc
β-prisma II
Lectinas vegetais específicas para α-D-manose
Lectinas vegetais específicas para α-D-manose
Lectina (aglutinina)
Anêmona gota-de-neve (*Galanthus nivalis*)



1cd8
Sanduíche β análogo a imunoglobulinas
Imunoglobulinas
Domínio análogo à região variável de imunoglobulinas
CD8
Homem (*Homo sapiens*)

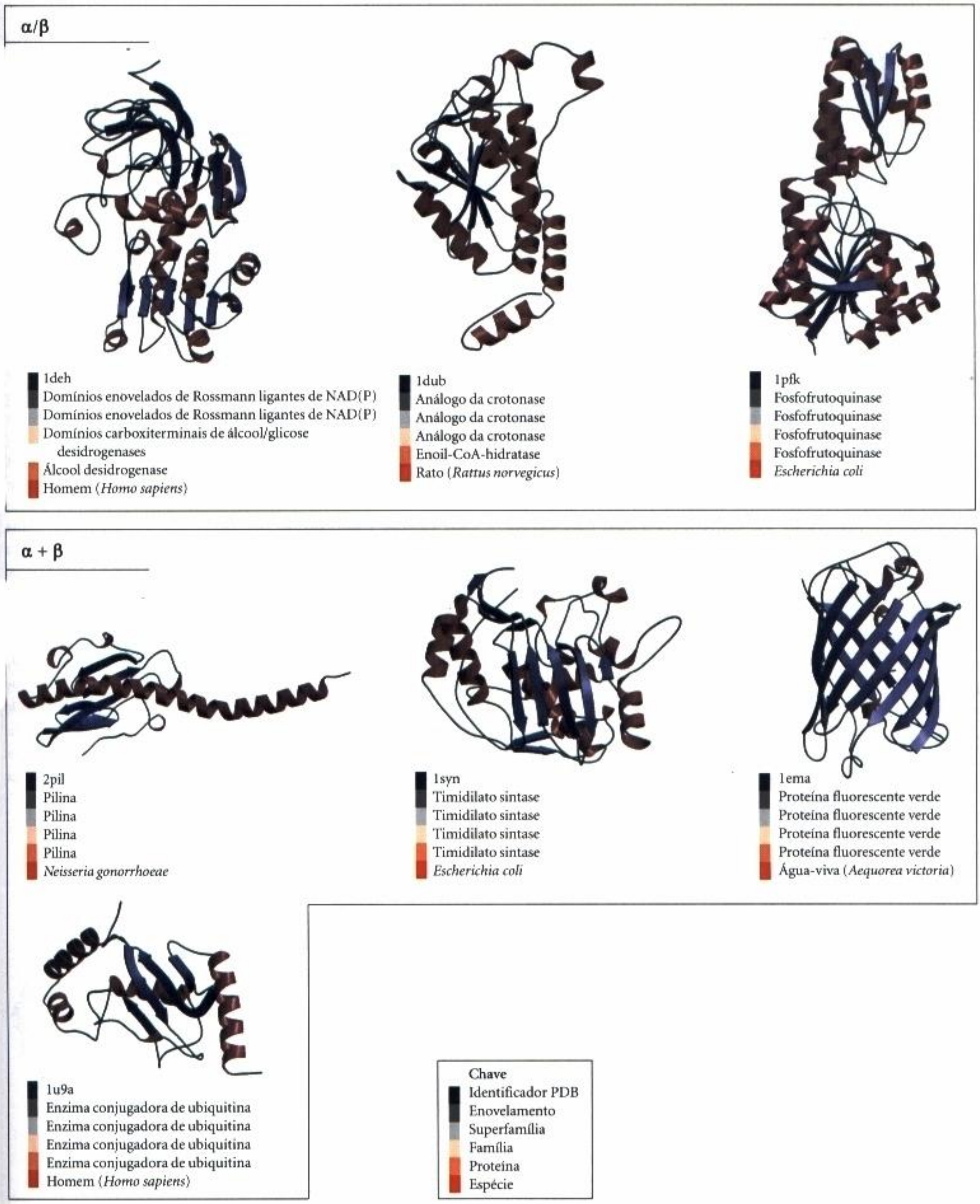

α/β
1deh
Domínios enovelados de Rossmann ligantes de NAD(P)
Domínios enovelados de Rossmann ligantes de NAD(P)
Domínios carboxiterminais de álcool/glicose desidrogenases
Álcool desidrogenase
Homem (*Homo sapiens*)
1dub
Análogo da crotonase
Análogo da crotonase
Análogo da crotonase
Enoil-CoA-hidratase
Rato (*Rattus norvegicus*)
1pfk
Fosfofrutoquinase
Fosfofrutoquinase
Fosfofrutoquinase
Fosfofrutoquinase
Escherichia coli
α + β
2pil
Pilina
Pilina
Pilina
Pilina
Neisseria gonorrhoeae
1syn
Timidilato sintase
Timidilato sintase
Timidilato sintase
Timidilato sintase
Escherichia coli
1ema
Proteína fluorescente verde
Proteína fluorescente verde
Proteína fluorescente verde
Proteína fluorescente verde
Água-viva (*Aequorea victoria*)
1u9a
Enzima conjugadora de ubiquitina
Enzima conjugadora de ubiquitina
Enzima conjugadora de ubiquitina
Enzima conjugadora de ubiquitina
Homem (*Homo sapiens*)
Chave
Identificador PDB
Enovelamento
Superfamília
Família
Proteína
Espécie

Figura 6-22 – Organização das proteínas baseadas em motivos. Aqui é mostrado apenas um pequeno número de centenas de motivos estáveis conhecidos. Estes motivos são divididos em quatro classes: toda α, toda β, α/β e α + β. São também mostrados os dados de classificação estrutural obtidos do banco de dados SCOP, facilmente acessível pela Web. O identificador PDB é um número único para cada estrutura protéica armazenada no Protein Data Bank. O barril α/β, mostrado na Figura 6-21, é outro motivo α/β particularmente comum.

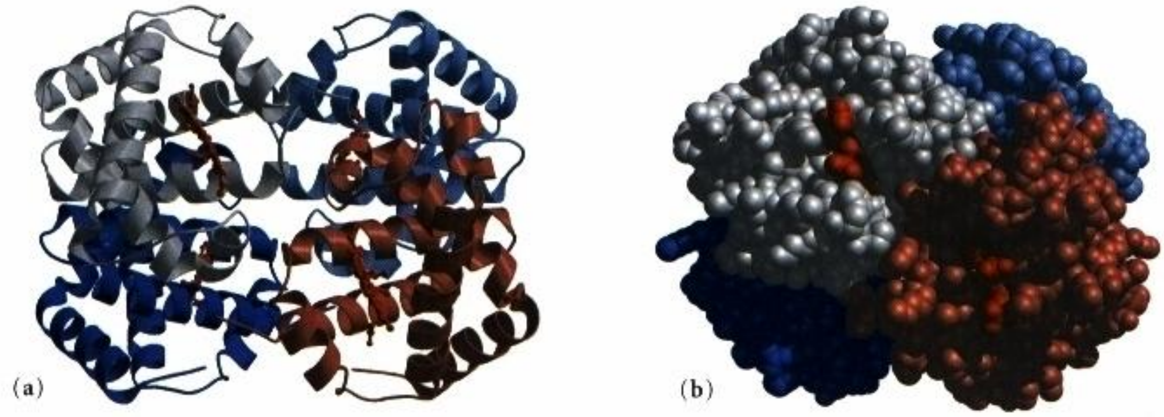


Figura 6-23 – A estrutura quaternária da desoxiemoglobina. Análise por difração de raios X da desoxiemoglobina (hemoglobina sem moléculas de oxigênio ligadas aos grupos heme) mostra como as quatro subunidades polipeptídicas estão empacotadas. (**a**) Representação em fita. (**b**) Modelo espaço-cheio. As subunidades α aparecem em cinza e azul-claro; as subunidades β em cor-de-rosa e azul-escuro. Observe que os grupos heme (em vermelho) estão relativamente afastados uns dos outros.

As subunidades idênticas de proteínas multiméricas são geralmente dispostas em um ou em um limitado conjunto de padrões simétricos. Uma descrição da estrutura dessas proteínas requer uma compreensão das convenções usadas para definir simetrias. Os oligômeros podem apresentar tanto **simetria rotacional** como **simetria helicoidal**, ou seja, as subunidades podem ser sobrepostas a outras (até coincidirem) por rotação em torno de um ou mais eixos rotacionais ou por uma rotação helicoidal. Em proteínas com simetria rotacional, as subunidades empacotam-se em torno do eixo rotacional para formar estruturas fechadas. As proteínas com simetria helicoidal tendem a formar estruturas que se apresentam mais abertas nas extremidades, com subunidades formando um arranjo espiralado.

Há diversas formas de simetria rotacional. A mais simples é a **simetria cíclica**, que envolvem rotações em torno de um único eixo (Fig. 6-24a). Se as subunidades podem ser sobrepostas pela rotação em torno de um único eixo, a proteína apresenta uma simetria definida pela convenção C_n (C de cíclica, n sendo o número de subunidades relacionadas pelo eixo). O eixo por si só é descrito como sendo um eixo rotacional de ordem n. Os protômeros $\alpha\beta$ da hemoglobina (Fig. 6-23) estão relacionados por uma simetria C_2. Uma simetria rotacional mais complicada é a **simetria diédrica**, na qual um eixo rotacional duplo interage com um eixo de ordem n em ângulos retos. A simetria é definida como D_n (Fig. 6-24b). Uma proteína com simetria diédrica possui $2n$ protômeros.

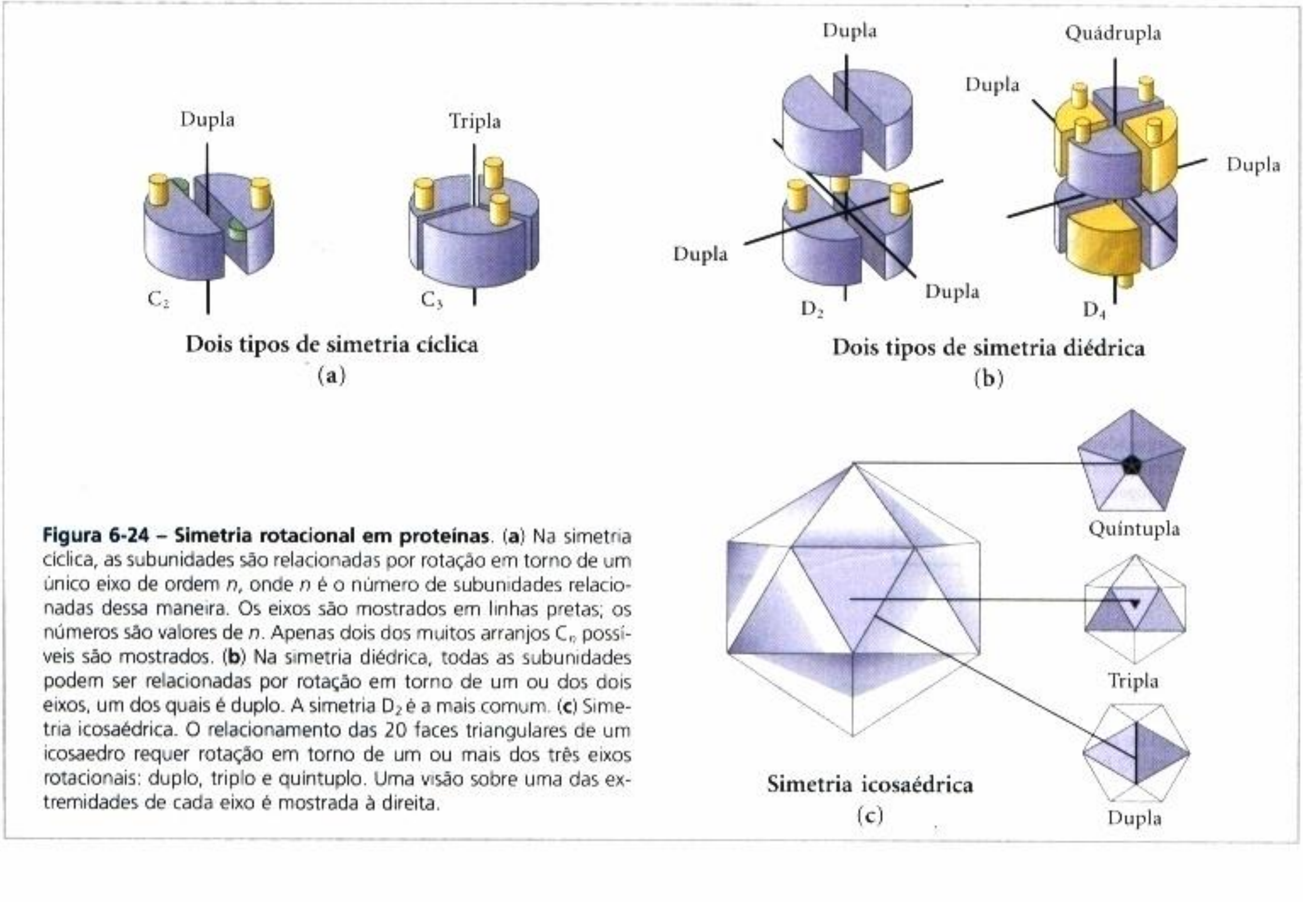


Figura 6-24 – Simetria rotacional em proteínas. (**a**) Na simetria cíclica, as subunidades são relacionadas por rotação em torno de um único eixo de ordem n, onde n é o número de subunidades relacionadas dessa maneira. Os eixos são mostrados em linhas pretas; os números são valores de n. Apenas dois dos muitos arranjos C_n possíveis são mostrados. (**b**) Na simetria diédrica, todas as subunidades podem ser relacionadas por rotação em torno de um ou dos dois eixos, um dos quais é duplo. A simetria D_2 é a mais comum. (**c**) Simetria icosaédrica. O relacionamento das 20 faces triangulares de um icosaedro requer rotação em torno de um ou mais dos três eixos rotacionais: duplo, triplo e quíntuplo. Uma visão sobre uma das extremidades de cada eixo é mostrada à direita.

As proteínas com simetria cíclica ou diédrica são particularmente comuns. Simetrias rotacionais mais complexas são possíveis, mas apenas algumas são regularmente encontradas. Um exemplo é a simetria icosaédrica. Um icosaedro é um poliedro regular de 12 arestas possuindo 20 faces triangulares equiláteras (Fig. 6-24c). Cada face pode se tornar coincidente com outra por rotação em torno de um ou mais dos três eixos rotacionais. Essa é uma estrutura comum em envoltórios virias ou capsídios. O poliovírus humano apresenta um capsídio icosaédrico (Fig. 6-25a). Cada face triangular é formada por três protômeros, cada um contendo cópias únicas de quatro cadeias polipeptídicas diferentes, três das quais acessíveis a partir da superfície externa. Sessenta protômeros formam as 20 faces do icosaedro que recobre o material genético (RNA).

O outro tipo principal de simetria encontrado nos oligômeros, a simetria helicoidal, também ocorre nos capsídios. O vírus do mosaico do tabaco é um filamento helicoidal orientado para a direita e formado por 2.130 subunidades idênticas (Fig. 6-25b). Essa estrutura cilíndrica envolve o RNA viral. As proteínas com subunidades arranjadas em filamentos helicoidais também podem formar longas estruturas fibrosas, como os filamentos de actina do músculo (veja Fig. 7-30).

Há limites para o tamanho das proteínas

O tamanho relativamente grande das proteínas reflete as suas funções. A função de uma enzima, por exemplo, requer uma estrutura estável que contém um bolsão largo o suficiente para que ocorra a ligação de seu substrato e, conseqüentemente, a catálise da reação na qual está envolvida. O tamanho das proteínas apresenta, entretanto, limites impostos por dois fatores: a capacidade de codificação genética dos ácidos nucléicos e a exatidão do processo de biossíntese protéica. O uso de diversas cópias de uma ou de algumas proteínas para gerar uma estrutura envolvente de grande tamanho (capsídio) é importante para os vírus porque essa estratégia conserva o material genético. Lembre-se de que há uma correspondência linear entre a seqüência de um gene em um ácido nucléico e a seqüência de aminoácidos de uma proteína para a qual codifica (veja Adendo 5-2). Os ácidos nucléicos dos vírus são muito pequenos para codificar a informação necessária para se ter um revestimento protéico feito de um único polipeptídeo. Utilizando diversas cópias de polipeptídeos bem menores, um ácido nucléico bem menor faz-se necessário para codificar as subunidades do capsídio e esse ácido nucléico pode ser usado eficientemente por várias vezes. As células também utilizam grandes complexos de polipeptídeos em músculos, cílios, citoesqueleto e outras estruturas. Simplesmente é mais eficiente fazer várias cópias de um polipeptídeo pequeno do que uma cópia de uma proteína muito grande. De fato, a maioria das proteínas com peso molecular acima de 100.000 possui múltiplas subunidades, idênticas ou não. O segundo fator limitante para o tamanho das proteínas é a freqüência de erros durante a biossíntese de proteínas. A freqüência de erros é baixa (cerca de 1 erro para cada 10.000 resíduos de aminoácidos adicionados), mas mesmo essa baixa freqüência resulta em uma alta probabilidade de se ter uma proteína danificada, se esta for muito grande. Posto de forma mais simples, o potencial para a incorporação de um aminoácido "errado" em uma proteína é maior para uma grande proteína do que para uma pequena proteína.

Desnaturação Protéica e Enovelamento

Todas as proteínas iniciam sua existência no ribossomo como uma seqüência linear de resíduos de aminoácidos (Capítulo 27). Esse polipeptídeo deve enovelar-se durante e em seguida à síntese, a fim de atingir a sua conformação nativa. Vimos que uma conformação nativa é apenas ligeiramente estável. Alterações modestas no meio em que se localiza a proteína podem levar a alterações estruturais que afetam a sua função. Exploraremos a seguir a transição que ocorre entre os estados enovelado e desenovelado.

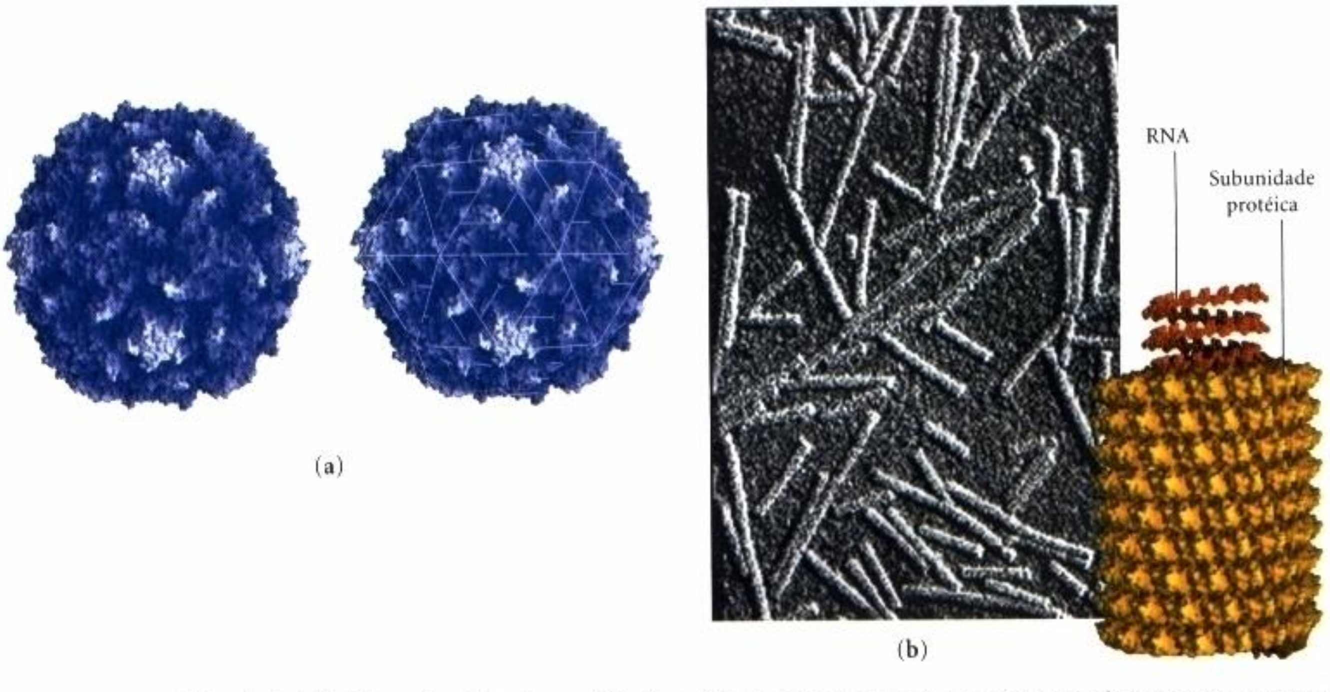


Figura 6-25 – Capsídios virais. (**a**) Poliovírus. A proteína do envoltório dos poliovírus assemelha-se a um icosaedro de 300Å de diâmetro. A simetria icosaédrica é um tipo de simetria rotacional (veja Fig. 6-24c). À esquerda está uma imagem de contorno de superfície do capsídio do poliovírus. Na imagem à direita, as linhas foram sobrepostas para mostrar os eixos de simetria. (**b**) Vírus do mosaico do tabaco. Esse vírus em forma de bastão (como mostrado na micrografia eletrônica) apresenta um comprimento de 3.000Å e um diâmetro de 180Å. Possui simetria helicoidal.

A perda da estrutura protéica resulta na perda de função

As estruturas protéicas adquiriram a sua função em um meio celular específico. Diferentes condições daquelas presentes no interior das células podem resultar em maiores ou menores alterações na estrutura das proteínas. Uma perda da estrutura tridimensional suficiente para causar perda de função é denominada **desnaturação**. O estado desnaturado não necessariamente corresponde a um desenovelamento completo da proteína e a uma randomização da conformação. Sob a maioria das condições, as proteínas desnaturadas existem em um conjunto de estados parcialmente enovelados pouco conhecidos.

A maioria das proteínas pode ser desnaturada pelo calor, que afeta as interações fracas em uma proteína (principalmente as ligações de hidrogênio) de forma complexa. Se a temperatura se eleva lentamente, uma conformação protéica geralmente permanece intacta até que haja uma perda abrupta de estrutura (e função) em uma faixa estreita de temperaturas (Fig. 6-26). Essa alteração repentina sugere que o desenovelamento é um processo cooperativo: a perda de estrutura em uma parte da proteína desestabiliza outras partes. Os efeitos do calor sobre as proteínas não são ainda facilmente predizíveis. As proteínas termoestáveis das bactérias termofílicas evoluíram no sentido de serem funcionais nas temperaturas de fontes geotermais (~100°C). No entanto, as estruturas dessas proteínas freqüentemente diferem muito pouco das estruturas de proteínas homólogas derivadas de bactérias como a *Escherichia coli*. De que modo essas pequenas diferenças promovem estabilidade estrutural em altas temperaturas é algo ainda não compreendido.

As proteínas podem ser desnaturadas não apenas pelo calor, mas por extremos de pH, por certos solventes orgânicos miscíveis com a água, como o álcool ou a acetona, por certos solutos como uréia e cloridrato de guanidínio ou por detergentes. Cada um desses agentes desnaturantes representa um tratamento relativamente brando no sentido de que nenhuma ligação covalente na cadeia polipeptídica é rompida. Os solventes orgânicos, a uréia e os detergentes atuam principalmente promovendo o rompimento de interações hidrofóbicas que estabilizam as proteínas globulares; os extremos de pH alteram a carga líquida da proteína, provocando repulsão eletrostática e rompimento de algumas ligações de hidrogênio. Os estados desnaturados obtidos por esses diversos tratamentos não são necessariamente equivalentes.

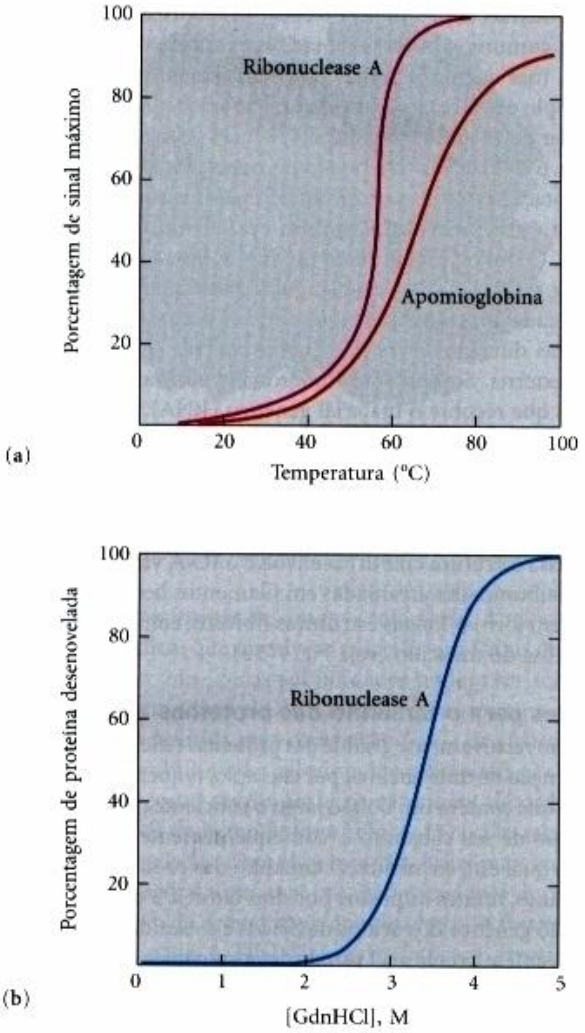


Figura 6-26 – Desnaturação protéica. Os resultados são mostrados para proteínas desnaturadas por duas alterações ambientais diferentes. Em cada caso, a transição do estado enovelado para o desenovelado é um tanto abrupto, sugerindo cooperatividade no processo de desenovelamento. **(a)** A desnaturação térmica da apomioglobina de cavalo (mioglobina sem o grupo prostético heme) e da ribonuclease A (com suas ligações dissulfeto intactas, veja Fig. 6-27). O ponto médio da faixa de temperaturas em que ocorre a desnaturação é denominado temperatura de fusão ("melting"), ou T_m. A desnaturação da apomioglobina foi monitorada por dicroísmo circular, uma técnica que mede a quantidade de estrutura helicoidal em uma molécula. A desnaturação da ribonuclease A foi determinada pelo monitoramento das alterações na fluorescência intrínseca da proteína, que é afetada por alterações no ambiente dos resíduos de Trp. **(b)** Desnaturação da ribonuclease A intacta pelo cloridrato de guanidínio (GdnHCl), monitorado por dicroísmo circular.

A seqüência de aminoácidos determina a estrutura terciária

A estrutura terciária de uma proteína globular é determinada pela sua seqüência de aminoácidos. A prova mais importante disso vem de experimentos que mostram que a desnaturação de algumas proteínas é reversível. Certas proteínas globulares desnaturadas por calor, extremos de pH ou reagentes desnaturantes retornarão a sua estrutura nativa e a sua atividade biológica se forem repostas nas condições em que a conformação nativa seja estável. Esse processo é denominado **renaturação**.

Um exemplo clássico é a desnaturação e a renaturação da ribonuclease. A ribonuclease purificada pode ser completamente desnaturada por exposição a uma solução concentrada de uréia em presença de um agente redutor. O agente redutor rompe as quatro ligações dissulfeto, produzindo oito resíduos de Cys, e a uréia rompe as interações hidrofóbicas estabilizantes, liberando assim todo o polipeptídeo de sua conformação enovelada. A desnaturação da ribonuclease é acompanhada por uma perda completa na atividade catalítica. Quando a uréia e o agente redutor são removidos, a ribonuclease desnaturada, na forma de uma cadeia de conformação aleatória, espontaneamente retorna à sua estrutura terciária correta, com a restauração completa de sua atividade catalítica (Fig. 6-27). O reenovelamento da ribonuclease é tão preciso que as quatro ligações dissulfeto intracadeia são reformadas nas mesmas posições que ocupavam na molécula nativa de ribonuclease. Cálculos matemáticos demonstram que os oito resíduos de Cys poderiam se recombinar ao acaso para formar ligações dissulfeto de 105 modos diferentes. De fato, uma distribuição essencialmente aleatória das ligações dissulfeto era obtida quando se deixavam reformar em presença de um desnaturante, indicando que as interações fracas são necessárias para o posicionamento correto das ligações dissulfeto e o estabelecimento da conformação nativa.

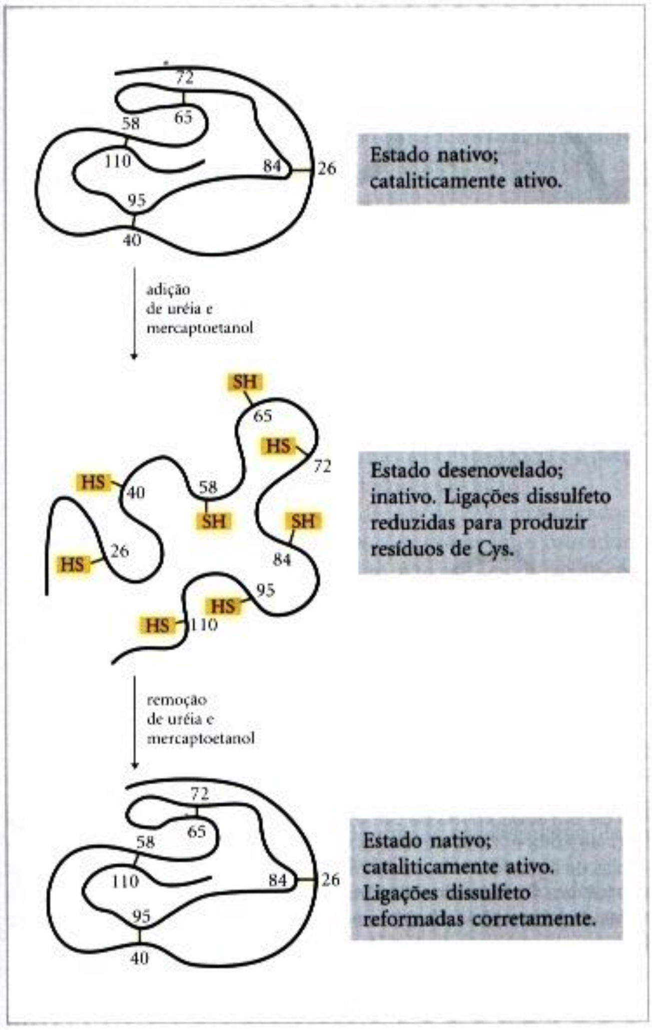

72
58
65
110
84
26
95
40
Estado nativo; cataliticamente ativo.
adição de uréia e mercaptoetanol
SH
65
HS
72
HS
40
58
SH
SH
HS
26
84
95
HS
HS
110
Estado desenovelado; inativo. Ligações dissulfeto reduzidas para produzir resíduos de Cys.
remoção de uréia e mercaptoetanol
72
58
65
110
84
26
95
40
Estado nativo; cataliticamente ativo. Ligações dissulfeto reformadas corretamente.

Figura 6-27 – Renaturação da ribonuclease desenovelada e desnaturada. A uréia é usada para desnaturar a ribonuclease, e o mercaptoetanol ($HOCH_2CH_2SH$), para reduzir e assim romper as ligações dissulfeto, gerando oito resíduos de Cys. A renaturação envolve o restabelecimento das ligações dissulfeto corretas.

Esse experimento clássico, executado por Christian Anfinsen na década de 1950, forneceu a primeira evidência de que a seqüência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica contém toda a informação necessária para o enovelamento da cadeia em sua estrutura tridimensional nativa. Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se ribonuclease cataliticamente ativa sintetizada quimicamente. Isso eliminou a possibilidade de que algum contaminante minoritário na preparação de ribonuclease purificada de Anfinsen pudesse ter contribuído para a renaturação da enzima, dissipando quaisquer dúvidas remanescentes de que essa enzima se enovela espontaneamente.

Os polipeptídeos se enovelam rapidamente por um processo em etapas

Nas células vivas, as proteínas são construídas a partir de aminoácidos, em velocidades bastante altas. Por exemplo, as células de *E. coli* podem fazer uma molécula protéica biologicamente ativa, contendo 100 resíduos de aminoácidos em cerca de 5s a 37°C. Como essa cadeia polipeptídica atinge a sua conformação nativa? Consideremos, de forma conservadora, que cada um dos resíduos de aminoácidos possa assumir até 10 diferentes conformações em média, o que daria 10^{100} conformações diferentes para o polipeptídeo. Consideremos, também, que a proteína se enovela espontaneamente por um processo aleatório no qual são tentadas todas as conformações possíveis em torno de cada ligação simples de sua cadeia polipeptídica, até que seja encontrada a sua forma nativa, biologicamente ativa. Se cada conformação fosse testada no tempo mais curto possível ($\sim 10^{-13}$s, ou o tempo necessário para uma única vibração molecular), levaria 10^{77} anos para que todas as possíveis conformações pudessem ser testadas. Dessa forma, o enovelamento protéico não pode ser um processo completamente aleatório, de ensaio e erro. Deve haver atalhos. Esse problema foi inicialmente levantado por Cyrus Levinthal em 1968 e às vezes é denominado de paradoxo de Levinthal.

A via de enovelamento de um grande polipeptídeo é inquestionavelmente complicada e nem todos os princípios que orientam o processo foram esclarecidos. Entretanto, longos estudos levaram ao desenvolvimento de diversos modelos plausíveis. Em um deles, o processo de enovelamento é visto de forma hierárquica. As estruturas secundárias locais formam-se inicialmente. Certas seqüências de aminoácidos enovelam-se rapidamente em α-hélices ou folhas β, guiadas pelos parâmetros que vimos em nossa discussão sobre a estrutura secundária. Seguem-se as interações envolvendo maiores distâncias entre, digamos, duas α-hélices que interagem para formar uma estrutura supersecundária estável. O processo continua até a formação de domínios completos e o completo enovelamento do polipeptídeo (Fig. 6-28). Em um modelo alternativo, o enovelamento inicia-se pelo colapso espontâneo do polipeptídeo em um estado compacto, mediado por interações hidrofóbicas entre resíduos apolares. O estado resultante desse "colapso hidrofóbico" pode ter um conteúdo elevado de estrutura secundária, mas muitas cadeias laterais de aminoácidos não estarão totalmente fixas. Esse estado é freqüentemente chamado de **glóbulo fundido** ("molten globule").

A maioria das proteínas provavelmente se enovela por um processo que incorpora características dos dois modelos. Em vez de seguir uma única via, uma população de moléculas peptídicas pode seguir diversos caminhos até um mesmo destino final, com a redução progressiva das espécies parcialmente enoveladas à medida que o processo de enovelamento se aproxima da conformação final.

Termodinamicamente, o processo de enovelamento pode ser visto como uma espécie de funil de energia livre (Fig. 6-29). Os estados não-enovelados são caracterizados por um alto grau de entropia conformacional e uma energia livre relativamente elevada. À medida que o enovelamento ocorre, o estreitamento do funil representa uma redução do número de espécies conformacionais presentes. Pequenas depressões ao longo das laterais do funil de energia livre representam intermediários semi-estáveis que podem alentecer brevemente o processo de enovelamento. No fundo do funil, um conjunto de intermediários de enovelamento reduz-se a uma única conformação nativa (ou a um pequeno conjunto delas).

Defeitos no enovelamento protéico podem ser as bases moleculares de uma ampla gama de desordens genéticas humanas. Por exemplo, a fibrose cística é provocada por defeitos em uma proteína de membrana, denominada regulador da condutividade transmembrânica da fibrose cística (CFTR), que atua como um canal para íons cloreto. A mutação mais comum que causa a fibrose cística é a deleção de um resíduo de Phe na posição 508 da CFTR, o que causa um enovelamento incorreto (veja Adendo 12-3). Muitas das mutações relacionadas com as doenças no colágeno (pág. 134) também provocam enovelamentos defeituosos. Uma maior compreensão do processo de enovelamento protéico pode levar a novas terapias para essas e muitas outras doenças (Adendo 6-4).

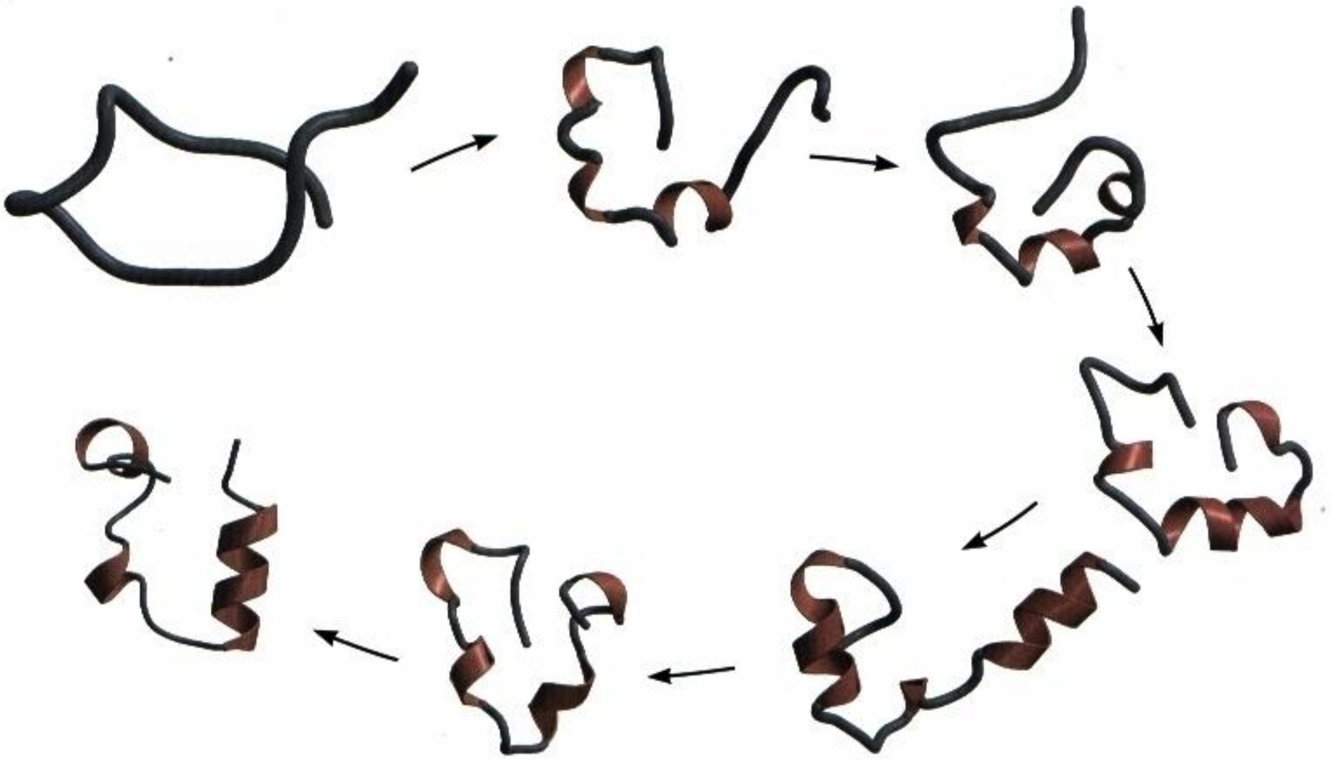


Figura 6-28 – Uma via de enovelamento simulada. A via de enovelamento de um subdomínio de 36 resíduos pertencente à proteína vilina foi simulada por computação. O processo inicia-se com o peptídeo em conformação aleatória e 3.000 moléculas de água que o rodeiam em uma "caixa d'água" virtual. Os movimentos moleculares do peptídeo e os efeitos das moléculas de água foram levados em consideração no mapeamento das vias mais prováveis que levam à formação do produto final entre as incontáveis alternativas. O enovelamento simulado foi executado em um período de tempo teórico de 1μs; no entanto, o cálculo necessitou de meio bilhão de etapas de integração rodando em dois supercomputadores Cray durante dois meses. (Coordenadas fornecidas por cortesia de Yong Duan e Peter A. Kollman, Universidade da Califórnia em São Francisco.)

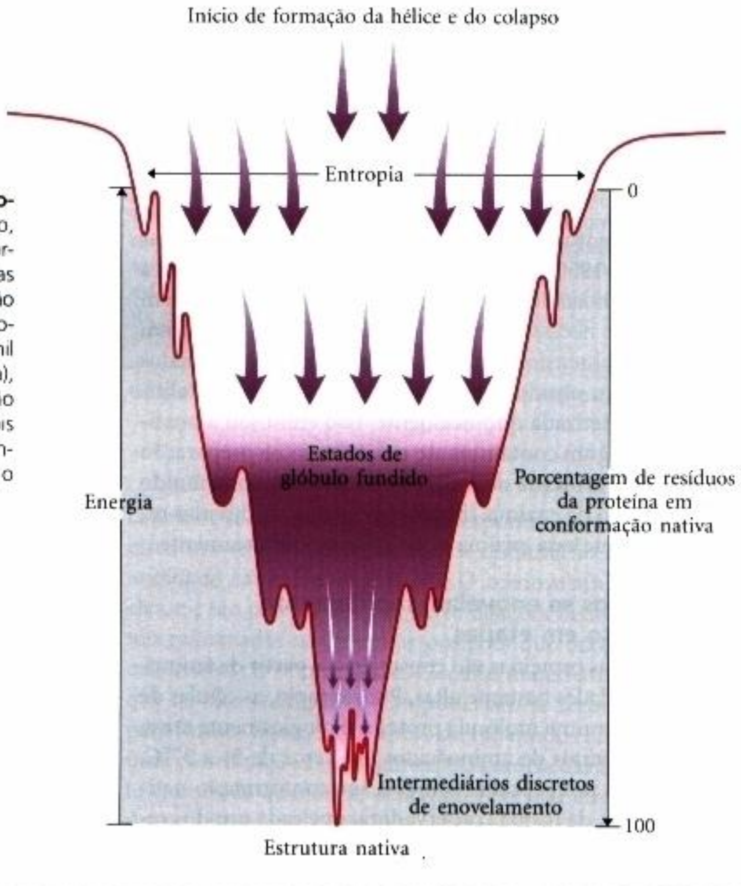

Início de formação da hélice e do colapso
Entropia
0
Energia
Estados de glóbulo fundido
Porcentagem de resíduos da proteína em conformação nativa
Intermediários discretos de enovelamento
100
Estrutura nativa

Figura 6-29 – A termodinâmica do enovelamento protéico ilustrada como um funil de energia livre. Ao alto, o número de conformações e, portanto, a entropia conformacional são elevados. Apenas uma pequena parte das interações intramoleculares que existirão na conformação nativa está presente. À medida que o enovelamento progride, a via termodinâmica em direção ao fundo do funil reduz o número de estados presentes (reduz a entropia), aumentando a quantidade de proteína na conformação nativa e reduzindo a energia livre. As depressões nos dois lados do funil representam intermediários de enovelamento semi-estáveis, que podem, em alguns casos, retardar o processo de enovelamento.

Adendo 6-4 A morte por enovelamento incorreto: a doença do príon

Uma proteína incorretamente enovelada parece ser o agente causador de diversos tipos de raras doenças cerebrais degenerativas em mamíferos. Talvez a mais conhecida delas seja a doença da vaca louca, cujo surgimento repentino ganhou as manchetes internacionais no outono de 1996. Doenças a ela relacionadas incluem o kuru e a doença de Creutzfeldt-Jacob em humanos e o "scrapie" (arranhadura) em ovinos. Essas doenças são geralmente denominadas de encefalopatias espongiformes, uma vez que nelas o cérebro freqüentemente apresenta diversas perfurações (Fig. 1). Os sintomas típicos incluem a demência e a perda de coordenação. Essas doenças são fatais.

Na década de 1960, investigadores verificaram que preparações dos agentes causadores dessas doenças pareciam não ter ácidos nucléicos. Por essa época, Tikvah Alper sugeriu que o agente poderia ser uma proteína. Inicialmente, a idéia parecia herética. Todos os agentes causadores de doenças conhecidas até então — vírus, bactérias, fungos e outros — continham ácidos nucléicos, e sua virulência relacionava-se com a reprodução e a propagação genéticas. Entretanto, três décadas de investigações, feitas principalmente por Stanley Prusiner, forneceram evidências de que as encefalopatias espongiformes eram diferentes.

O agente infeccioso foi determinado como sendo uma única proteína (M_r 28.000), a que Prusiner denominou proteína príon (PrP). A proteína príon é um constituinte normal do tecido cerebral em todos os mamíferos. Sua função não é conhecida. Cepas de camundongos que não apresentam o gene para PrP (e, portanto, a própria proteína) não aparentam sofrer de nenhuma doença. A doença ocorre apenas quando a PrP celular normal, ou PrP^{C}, aparece em uma conformação alterada, denominada PrP^{Sc} (Sc provém de "scrapie"). A interação da PrP^{Sc} com a PrP^{C} converte esta última em PrP^{Sc}, iniciando um efeito dominó pelo qual quantidades crescentes da proteína celular são convertidas na forma causadora da doença. O mecanismo pelo qual a presença de PrP^{Sc} leva à encefalopatia espongiforme não é conhecido.

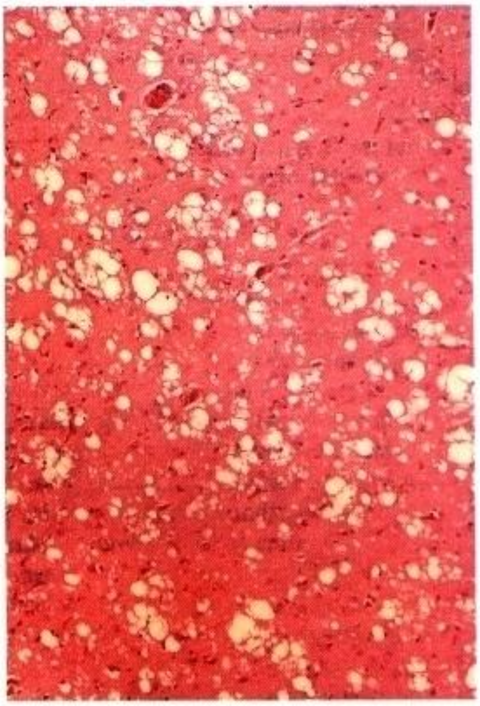


Figura 1 – Uma secção corada de córtex cerebral de um paciente com a doença de Creutzfeldt-Jacob mostra a degeneração espongiforme (vacuolar), a principal característica neuroistológica. Os vacúolos (manchas brancas) são intracelulares e ocorrem principalmente nos processos pré e pós-sinápticos dos neurônios. Os vacúolos nesta secção variam de 20 a 100μm de diâmetro.

Em formas herdadas das doenças do príon, uma mutação no gene que codifica PrP produz uma alteração em um resíduo de aminoácido que se crê ser o responsável mais provável pela conversão de PrP^{C} em PrP^{Sc}. Um entendimento completo das doenças do príon aguarda novas informações referentes à maneira de como a proteína príon afeta as funções cerebrais, bem como uma informação estrutural mais detalhada sobre as duas formas de PrP.

Algumas proteínas são submetidas a enovelamento assistido

Nem todas as proteínas se enovelam espontaneamente à medida que são sintetizadas pela célula. O enovelamento de muitas delas é facilitado pela ação de proteínas especializadas. As **assistentes moleculares** ("molecular chaperones") são proteínas que interagem com polipeptídeos parcialmente enovelados ou inadequadamente enovelados, facilitando as vias corretas de enovelamento ou fornecendo microambientes nos quais o enovelamento possa ocorrer. Duas classes de proteínas assistentes têm sido bastante estudadas. Ambas são encontradas em organismos variando desde bactérias até seres humanos. A primeira classe, uma família de proteínas denominada **Hsp70**, geralmente apresenta peso molecular em torno de 70.000 e é mais abundante em células estressadas por temperaturas elevadas (daí o nome proteínas de choque térmico, "heat shock proteins", de peso molecular 70.000, Hsp70). As proteínas Hsp70 ligam-se a regiões de polipeptídeos desenovelados, que são ricas em resíduos hidrofóbicos, prevenindo agregações não adequadas. Dessa forma, essas assistentes "protegem" as proteínas que foram desnaturadas pelo calor e os peptídeos que estão sendo sintetizados (e ainda estão desenovelados). As proteínas Hsp70 também impedem o enovelamento de certas proteínas que devem permanecer desenoveladas até serem translocadas através de membranas (descritas no Capítulo 27). Algumas assistentes também facilitam a montagem da estrutura quaternária de proteínas oligoméricas. As

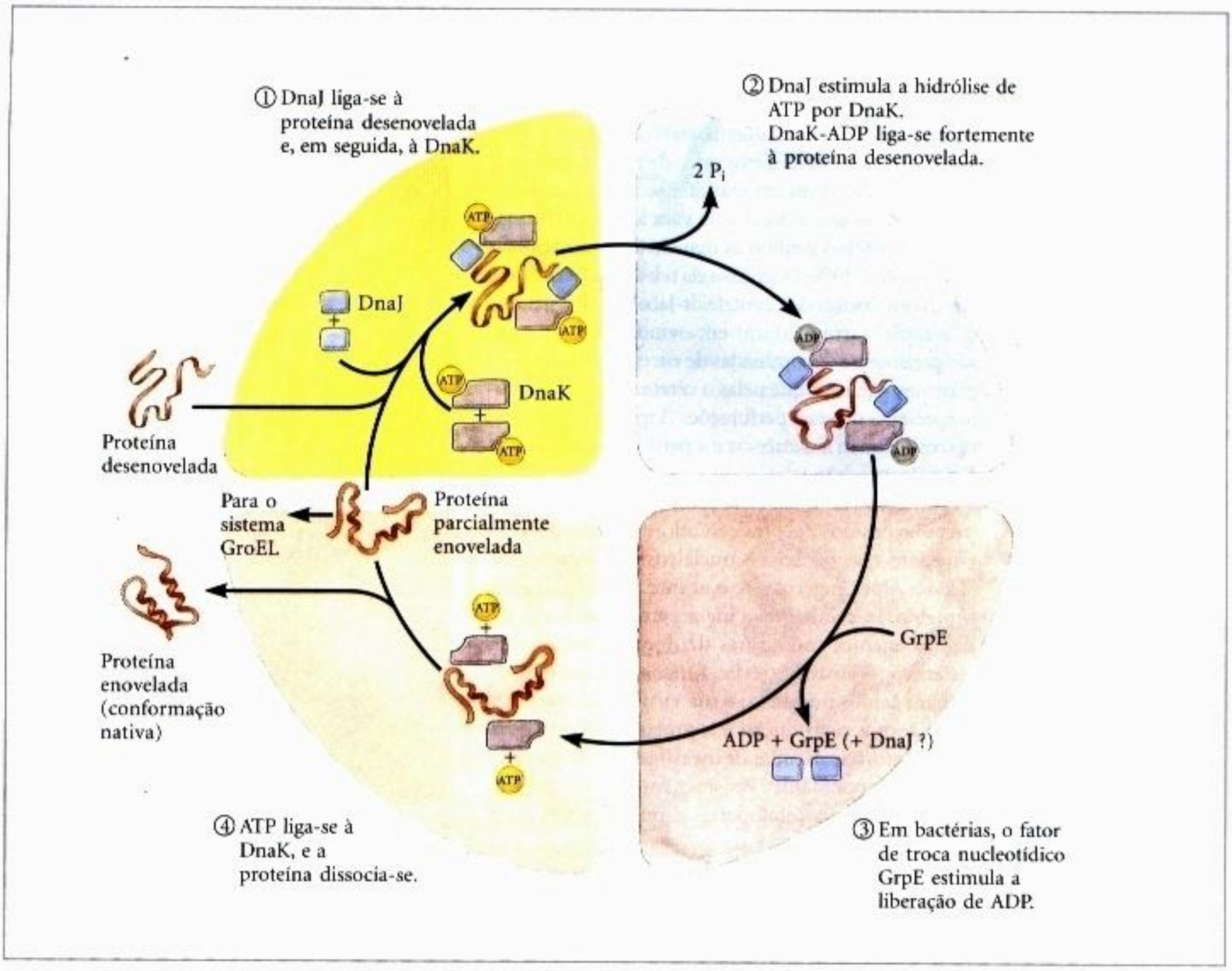

① DnaJ liga-se à proteína desenovelada e, em seguida, à DnaK.
② DnaJ estimula a hidrólise de ATP por DnaK. DnaK-ADP liga-se fortemente à proteína desenovelada.
2 P$_i$
ATP
DnaJ
DnaK
ADP
Proteína desenovelada
Para o sistema GroEL
Proteína parcialmente enovelada
Proteína enovelada (conformação nativa)
GrpE
ADP + GrpE (+ DnaJ ?)
④ ATP liga-se à DnaK, e a proteína dissocia-se.
③ Em bactérias, o fator de troca nucleotídico GrpE estimula a liberação de ADP.

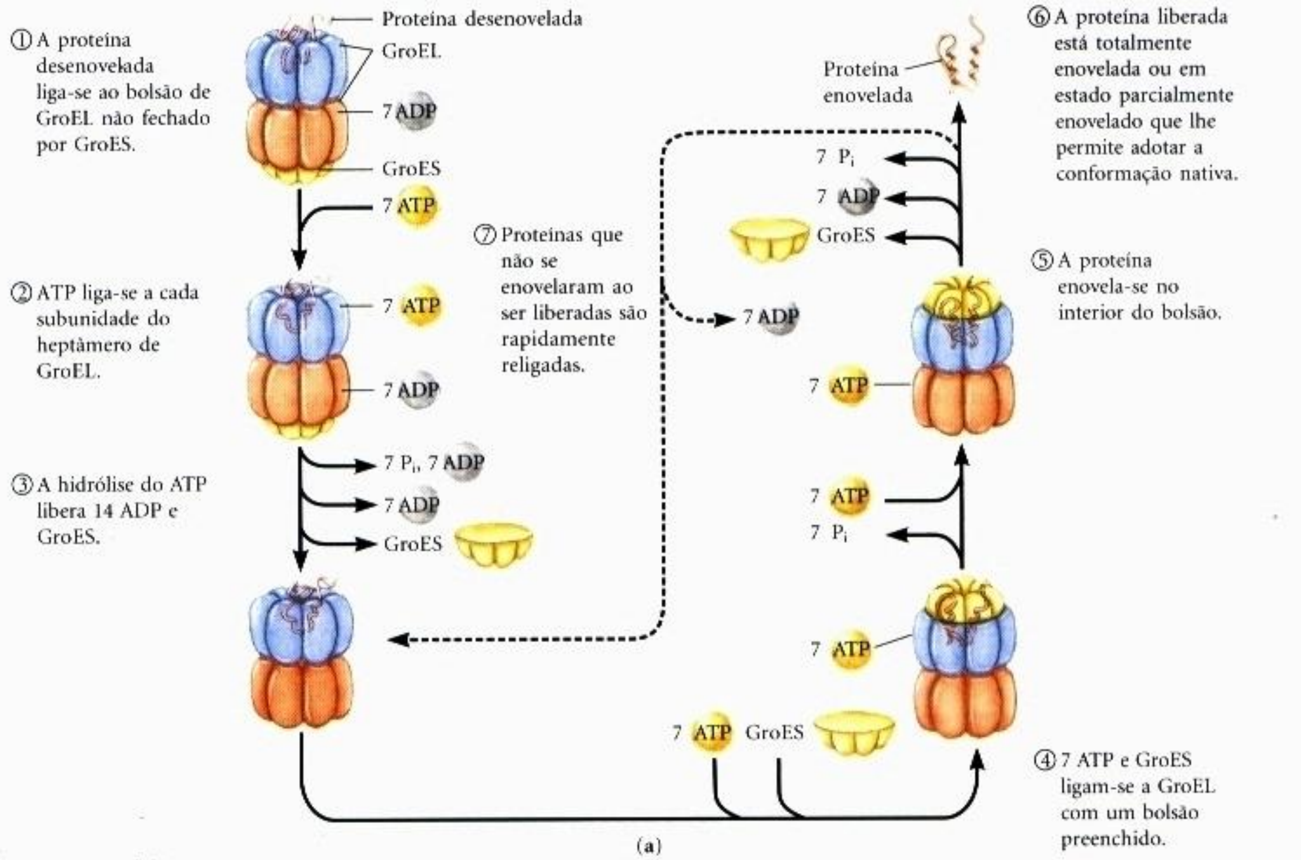
Figura 6-30 – As assistentes moleculares no enovelamento protéico. A via cíclica pela qual as assistentes moleculares se ligam e liberam polipeptídeos está ilustrada para as proteínas assistentes de *E. coli*, DnaK e DnaJ, homólogas das proteínas assistentes eucarióticas Hsp70 e Hsp40. As assistentes não promovem ativamente o enovelamento da proteína substrato, mas, em vez disso, previnem a agregação de peptídeos não-enovelados. Para uma população de polipeptídeos, uma parte dos polipeptídeos liberados ao término dó ciclo estará na conformação nativa. Os remanescentes são religados à DnaK ou encaminhados para o sistema de assistentes de enovelamento (GroEL, veja Fig. 6-31). Nas bactérias, uma proteína denominada GrpE interage transitoriamente com DnaK em uma etapa posterior do ciclo, promovendo a dissociação do ADP e, possivelmente, da DnaJ. Nenhum análogo eucariótico de GrpE é conhecido.

proteínas Hsp70 ligam-se e liberam polipeptídeos em um ciclo que também envolve diversas outras proteínas (incluindo uma classe chamada Hsp40) e a hidrólise de ATP. A Figura 6-30 ilustra o enovelamento auxiliado pelas proteínas assistentes DnaK e DnaJ de *E. coli*, homólogas das proteínas eucarióticas Hsp70 e Hsp40. As proteínas DnaK e DnaJ foram inicialmente identificadas como proteínas necessárias para a replicação *in vitro* de certas moléculas de DNA virais (daí a designação "Dna").

A segunda classe de assistentes moleculares é denominada **assistentes de enovelamento** ("chaperonins"). Estes são complexos protéicos elaborados necessários para o enovelamento de diversas proteínas celulares que não se enovelam espontaneamente. Em *E. coli*, estima-se que 10% a 15% das proteínas celulares necessitam de um sistema de assistentes de enovelamento residente, denominado GroEL/GroES, para o enovelamento sob condições normais (até 30% das proteínas necessitam desse sistema quando as células estão estressadas pelo calor). Essas proteínas se tornaram inicialmente conhecidas quando se verificou serem necessárias para o crescimento de certos vírus bacterianos (daí a designação "Gro"). Proteínas desenoveladas ligam-se a bolsões no complexo GroEL, os quais estão temporariamente fechados pela "tampa" GroES (Fig. 6-31). GroEL sofre alterações conformacionais substanciais, acopladas à hidrólise de ATP e à ligação e liberação de GroES, que promove o enovelamento do polipeptídeo ligado. Embora a estrutura do assistente de enovelamento GroEL/GroES seja conhecida, muitos detalhes de seu mecanismo de ação permanecem sem resolução.

Finalmente, as vias de enovelamento de diversas proteínas necessitam de duas enzimas que catalisam reações de isomerização. A **proteína dissulfeto isomerase (PDI)** é uma enzima amplamente distribuída que catalisa a troca ou o embaralhamento das ligações dissulfeto até que as ligações da conformação nativa sejam formadas. Entre as suas funções, PDI catalisa a eliminação de intermediários de enovelamento com ligações dissulfeto não apropriadas. A enzima **peptídeo prolil cis-trans isomerase (PPI)** catalisa a interconversão dos isômeros cis e trans de ligações peptídicas da prolina (Fig. 6-8b), o que pode ser uma etapa lenta no enovelamento de proteínas que contenham algumas ligações na conformação cis.

O enovelamento protéico é, provavelmente, um processo bem mais complexo no meio celular densamente empacotado do que no tubo de ensaio. Outras classes de proteínas que facilitem o enovelamento protéico podem ser descobertas com o prosseguimento da dissecação bioquímica do processo de enovelamento protéico.


① A proteína desenovelada liga-se ao bolsão de GroEL não fechado por GroES.
Proteína desenovelada
GroEL
7 ADP
GroES
7 ATP
② ATP liga-se a cada subunidade do heptâmero de GroEL.
7 ATP
7 ADP
③ A hidrólise do ATP libera 14 ADP e GroES.
7 P_i, 7 ADP
7 ADP
GroES
⑦ Proteínas que não se enovelaram ao ser liberadas são rapidamente religadas.
7 ADP
Proteína enovelada
⑥ A proteína liberada está totalmente enovelada ou em estado parcialmente enovelado que lhe permite adotar a conformação nativa.
7 P_i
7 ADP
GroES
⑤ A proteína enovela-se no interior do bolsão.
7 ATP
7 ATP
7 P_i
7 ATP
7 ATP GroES
④ 7 ATP e GroES ligam-se a GroEL com um bolsão preenchido.
(a)

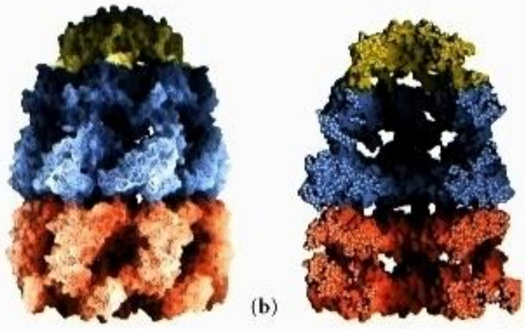


Figura 6-31 – As proteínas assistentes de enovelamento no enovelamento protéico. (**a**) Uma via proposta para a ação das proteínas assistentes de enovelamento de *E. coli*, GroEL (um membro da família de proteínas Hsp60) e GroES. Cada complexo GroEL consiste de dois grandes bolsões formados por dois anéis heptaméricos (cada subunidade com M_r 57.000). GroES, também um heptâmero (subunidades de M_r 10.000), fecha um dos bolsões de GroEL. (**b**) Imagem de superfície e corte longitudinal do complexo GroEL/GroES. O corte mostra o grande espaço interior onde outras proteínas se ligam.

Resumo

Cada proteína possui uma estrutura tridimensional característica que reflete a sua função. A estrutura protéica é estabilizada por múltiplas interações fracas. As interações hidrofóbicas fornecem a maior contribuição para estabilizar a forma globular da maioria das proteínas solúveis; as ligações de hidrogênio e as interações iônicas são otimizadas na estrutura específica que é termodinamicamente mais estável.

A natureza das ligações covalentes na cadeia polipeptídica impõe restrições estruturais. A ligação peptídica exibe caráter de dupla ligação parcial que mantém todo o grupo peptídico em uma configuração planar rígida. As ligações N—C_α e C_α—C podem girar com ângulos de ligação ϕ e ψ respectivamente. A estrutura secundária pode ser definida completamente se os ângulos ϕ e ψ forem conhecidos para todos os resíduos de aminoácidos em um determinado segmento polipeptídico.

A estrutura terciária, estrutura tridimensional completa de uma cadeia polipeptídica, pode ser compreendida pelo exame de subestruturas comuns e estáveis, denominadas estruturas supersecundárias, motivos ou dobras. Os motivos podem ser simples ou muito complexos. Os milhares de estruturas protéicas conhecidas são geralmente montadas a partir de um repertório de apenas algumas centenas de motivos, alguns dos quais são muito comuns. Regiões de uma cadeia polipeptídica que podem se enovelar de forma estável e independente são denominadas domínios. Pequenas proteínas geralmente possuem apenas um domínio, enquanto as maiores podem conter vários deles.

Há duas classes gerais de proteínas: fibrosas e globulares. As proteínas fibrosas, que possuem funções principalmente estruturais, apresentam elementos repetitivos simples de estrutura secundária e serviram de modelo para os primeiros estudos de estrutura protéica. Dois tipos principais de estrutura secundária foram preditos por modelos baseados em informações provenientes das proteínas fibrosas: a α-hélice e a conformação β. Ambas são caracterizadas pela existência de ligações de hidrogênio otimizadas entre as ligações peptídicas na cadeia polipeptídica. A estabilidade dessas estruturas em uma proteína é influenciada pelo conteúdo de resíduos de aminoácidos e pelo posicionamento relativo dos resíduos de aminoácidos na seqüência. Outro tipo de estrutura secundária comum em proteínas é a dobra β.

Em proteínas fibrosas, como as queratinas e o colágeno, predomina um único tipo de estrutura secundária. As cadeias polipeptídicas são superenoveladas em cordas que se combinam em arranjos maiores para fornecer resistência. As folhas β da fibroína da seda são empilhadas para formar uma estrutura resistente mais flexível.

As proteínas globulares apresentam estruturas terciárias mais complicadas, freqüentemente contendo vários tipos de estrutura secundária na mesma cadeia polipeptídica. A primeira estrutura de uma proteína globular a ser determinada usando-se métodos de difração de raios X foi a da mioglobina. A estrutura confirmou que uma estrutura secundária predita (α-hélice) ocorre nas proteínas, que os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos se localizam no interior da proteína e que as proteínas globulares são compactas. Estudos subseqüentes sobre a estrutura de muitas proteínas globulares confirmaram essas conclusões demonstrando a grande variedade possível de estruturas terciárias.

As estruturas complexas das proteínas globulares podem ser analisadas examinando-se as subestruturas, incluindo os motivos e os domínios. Em bancos de dados de estruturas protéicas, as estruturas são geralmente organizadas em quatro classes principais: toda α, toda β, α/β e α + β. As proteínas específicas de cada classe são agrupadas em famílias e superfamílias, baseadas em correlações de seqüências, estruturas e funções.

A estrutura quaternária refere-se à interação entre as subunidades de proteínas multissubunitárias (multiméricas) ou de grandes complexos protéicos. Algumas proteínas multiméricas apresentam uma unidade repetitiva que consiste de uma única subunidade ou de um grupo de subunidades denominadas protômeros. Os protômeros relacionam-se entre si geralmente por simetria rotacional ou helicoidal. A proteína multimérica mais bem estudada é a hemoglobina.

A estrutura tridimensional das proteínas pode ser destruída por tratamentos que rompem as interações fracas, um processo denominado desnaturação. A desnaturação destrói a função protéica, demonstrando a existência de uma relação entre estrutura e função. Algumas proteínas desnaturadas (por exemplo, a ribonuclease) podem se renaturar espontaneamente para formar uma proteína biologicamente ativa, mostrando que a estrutura terciária de uma proteína é determinada pela sua seqüência de aminoácidos.

O enovelamento de proteínas nas células, provavelmente, envolve diversas vias. Inicialmente, regiões de estrutura secundária podem se formar, seguidas pela formação de estruturas supersecundárias. Populações de intermediários de enovelamento são rapidamente levadas a uma única conformação nativa. Para diversas proteínas, o enovelamento é facilitado pelas assistentes moleculares Hsp70 e pelas assistentes de enovelamento. A formação de ligações dissulfeto e a isomerização cis-trans das ligações peptídicas que contêm prolina são catalisadas por enzimas específicas.

Leitura Adicional

Geral

Anfinsen CB. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.

O autor faz uma revisão de seu trabalho clássico sobre a ribonuclease.

Branden C & Tooze J. (1991) *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York.

Creighton TE. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma fonte completa e fidedigna.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quat. Biol.* **52**.

Uma fonte de excelentes artigos sobre diversos tópicos, incluindo estrutura protéica, enovelamento e função.

Kendrew JC. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* **205** (December), 96-111.

Descreve como a estrutura da mioglobina foi determinada e o que aprendemos dela.

Richardson JS. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.* **34**, 167-339.

Um resumo muito importante dos padrões e princípios em estrutura de proteínas; o autor criou a utilíssima representação "em fita" da estrutura de proteínas, a qual é empregada em várias ocasiões neste capítulo.

Estrutura secundária, terciária e quaternária

Brenner SE, Chothia C, & Hubbard TJP. (1997) Population statistics of protein structures: lessons from structural classificatins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 369-376.

Chothia C, Hubbard T, Brenner S, Barns H, & Murzin A. (1997) Protein folds in the all-β and all-α classes. *Annu. Rev. Physiol. Biomol. Struct.* **26**, 597-627.

Fuchs E & Cleveland DW. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-519.

McPherson A. (1989) Macromolecular crystals. *Sci. Am.* **260** (March), 62-69.

Descreve como são cristalizadas as macromoléculas como as proteínas.

Prockop DJ & Kivirikko KI. (1995) Collagens, molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 403-434.

Shoeman RL & Traub P. (1993) Assembly of intermediate filaments. *Bioessays* **15**, 605-611.

Desnaturação protéica e enovelamento

Aurora R, Creamer TP, Srinivasan R & Rose GD. (1997) Local interactions in protein folding: lessons from the α-helix. *J. Biol. Chem.* **272**, 1413-1416.

Baldwin RL. (1994) Matching speed and stability. *Nature* **369**, 183-184.

Creighton TE, Darby NJ, & Kemmink J. (1996) The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB J.* **10**, 110-118.

Dill KA & Chan HS. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* 4, 10-19.

Johnson JL & Craig EA. (1997) Protein folding *in vivo*: unraveling complex pathways. *Cell* **90**, 201-204.

Netzer WJ & Hartl FU. (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 68-73.

Prusiner SB. (1995) The prion diseases. *Sci. Am.* **272** (January), 48-57.

Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, & Cohen FE. (1998) Prion protein biology. *Cell* **93**, 337-348.

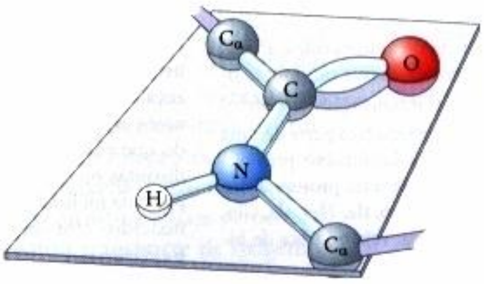
Richardson A, Landry SJ, & Georgopolous C. (1998) The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 138-143.

Ruddon, RR & Bedows E. (1997) Assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* **272**, 3125-3128.

Thomas PJ, Qu B-H, & Pederson PL. (1995) Defective protein foldings as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456-459.

Problemas

1. Propriedades da ligação peptídica. Por estudos com raios X de peptídeos cristalinos, Linus Pauling e Robert Corey concluíram que a ligação C—N na ligação peptídica é de tamanho intermediário (0,132nm) entre uma ligação C—N simples típica (0,149nm) e uma ligação dupla C═N (0,127nm). Eles também concluíram que a ligação peptídica é planar, ou seja, todos os átomos ligados ao grupo C—N estão localizados em um único plano e que os dois carbonos α ligados ao C—N são sempre trans (isto é, estão em lados opostos da ligação peptídica).



(a) O que indica o comprimento da ligação C—N na ligação peptídica a respeito da sua força e da sua ordem de ligação, isto é, se ela é simples, dupla ou tripla?

(b) O que nos diz as observações de Pauling e Corey a respeito da facilidade de rotação ao redor da ligação peptídica C—N?

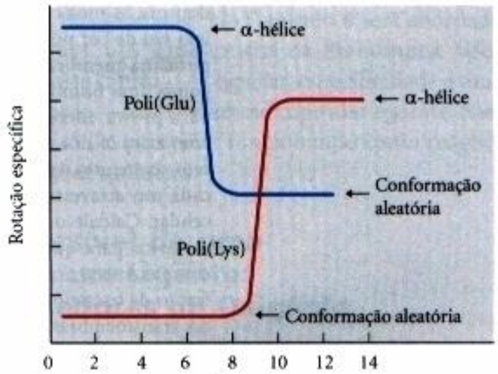
2. Relações estruturais e funcionais nas proteínas fibrosas. William Astbury descobriu que o padrão de difração dos raios X da lã mostra uma unidade estrutural repetitiva espaçada de aproximadamente 0,54nm ao longo da direção da fibra da lã. Quando ele submetia a lã ao vapor d'água e a esticava, o padrão de difração mostrava uma nova unidade estrutural repetitiva com espaçamento de 0,70nm. A lã submetida ao vapor d'água e deixada para encolher mostra um padrão de difração dos raios X consistente com espaçamento original de 0,54nm. Embora essas observações sejam pistas importantes para a estrutura molecular da lã, Astbury não conseguiu interpretá-las na época.

(a) Dado o conhecimento atual sobre a estrutura da lã, interprete as observações de Astbury.

(b) Quando suéteres ou meias de lã são lavados em água quente ou aquecidos em um secador, eles encolhem. A seda, por outro lado, não encolhe ao ser submetida às mesmas condições. Explique.

3. Velocidade de síntese da α-queratina do cabelo. Em termos humanos, o crescimento do cabelo é um processo lento, ocorrendo à velocidade de 15 a 20cm/ano. Todo esse crescimento está concentrado na base do fio de cabelo, em que os filamentos de α-queratina são sintetizados no interior de células epidérmicas vivas e arranjados em estruturas semelhantes a cordas (veja Fig. 6-11). O elemento estrutural básico da α-queratina é a α-hélice, a qual tem 3,6 resíduos de aminoácidos por volta e avança 0,54nm por volta (veja Fig. 6-4b). Supondo-se que a biossíntese das cadeias α-helicoidais da queratina é o fator limitante da velocidade de crescimento do cabelo, calcule a velocidade com a qual as ligações peptídicas dessas cadeias precisam ser sintetizadas (ligações peptídicas por segundo) para manter o crescimento anual do cabelo indicado anteriormente.

4. O efeito do pH na conformação de estruturas secundárias α-helicoidais. A ruptura da conformação em α-hélice de um polipeptídeo e seu conseqüente desenovelamento em uma conformação enrolada ao acaso é acompanhada por uma grande diminuição em uma propriedade chamada de poder rotatório específico, uma medida da capacidade da solução de fazer girar a luz plano-polarizada. O ácido poliglutâmico, um polipeptídeo feito unicamente de resíduos de ácido L-glutâmico, tem conformação em α-hélice em pH 3. Entretanto, quando o pH é elevado para 7, ocorre uma grande diminuição da rotação específica da solução. Igualmente, a polilisina (apenas resíduos de L-lisina) é uma α-hélice em pH 10, mas quando o pH cai para 7, a rotação específica também diminui, como mostrado no gráfico.



Qual é a explicação para o efeito das mudanças de pH sobre as conformações do ácido poliglutâmico e da polilisina? Por que a transição ocorre em intervalos de pH tão estreitos?

5. O conteúdo em pontes dissulfeto determina as propriedades mecânicas de muitas proteínas. Algumas proteínas naturais são muito ricas em pontes dissulfeto e suas propriedades mecânicas (resistência à tensão, viscosidade, dureza etc.) estão correlacionadas com o conteúdo dessas pontes. Por exemplo, a glutenina, uma proteína encontrada no trigo e rica em cistina, é responsável pelas características elásticas e coesivas da cola feita com farinha de trigo. De igual maneira, a natureza resistente e dura da casca da tartaruga é devida ao alto conteúdo em cistina de sua α-queratina.

(a) Qual é a base molecular da correlação entre o conteúdo em pontes dissulfeto e as propriedades mecânicas de uma proteína?

(b) A maioria das proteínas globulares é desnaturada e perde a atividade quando aquecida por breves períodos a 65°C. Entretanto, as proteínas globulares que contêm muitas ligações dissulfeto devem ser, freqüentemente, aquecidas por mais tempo em temperaturas mais elevadas para serem desnaturadas. Uma dessas proteínas é o inibidor pancreático bovino da tripsina (BPTI), que possui 58 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia e contém três ligações dissulfeto. Ao se resfriar uma solução de BPTI desnaturada, a atividade da proteína é restaurada. Qual é a base molecular para essa propriedade?

6. Seqüência de aminoácidos e estrutura protéica. Nossa crescente compreensão de como as proteínas se enovelam permite aos pesquisadores fazer predições sobre a estrutura protéica, baseadas nos dados de seqüência de aminoácidos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ile–	Ala–	His–	Thr–	Tyr–	Gly–	Pro–	Phe–	Glu–	Ala–
11	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
Ala–	Met–	Cys–	Lys–	Trp–	Glu–	Ala–	Gln–	Pro–	Asp–
21	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**		
Gly–	Met–	Glu–	Cys–	Ala–	Phe–	His–	Arg–		

(a) Baseando-se na seqüência de aminoácidos acima, onde você acha que podem ocorrer curvas ou dobras β?

(b) Onde podem ser formadas interligações dissulfeto?

(c) Considerando que esta seqüência faça parte de uma proteína globular maior, indique a localização provável (a superfície externa ou o interior de uma proteína) dos seguintes resíduos de aminoácidos: Asp, Ile, Thr, Ala, Gln, Lys. Explique o seu raciocínio. (Dica: veja o índice de hidropatia na Tabela 5-1.)

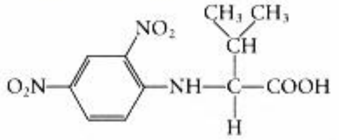
7. A bacteriorrodopsina é uma proteína púrpura de membrana. Sob condições apropriadas, a bactéria apreciadora de sal *Halobacterium halobium* sintetiza uma proteína de membrana (M_r 26.000) conhecida como bacteriorrodopsina, as moléculas dessa proteína contêm retinal, por isso são de cor púrpura e agregam-se em "manchas púrpura" na membrana celular. A bacteriorrodopsina age como uma bomba de prótons ativada pela luz e serve para prover energia para as funções celulares. Análises com raios X dessa proteína revelam que ela consiste de sete segmentos em α-hélice dispostos paralelamente e cada um atravessa a espessura de 4,5nm da membrana celular. Calcule o número mínimo de aminoácidos necessários para que um segmento de α-hélice atravesse completamente a membrana celular. Calcule, também, a fração de bacteriorrodopsina que está envolvida em hélices transmembranas (use peso molecular médio dos resíduos de aminoácidos igual a 110).

8. Ação patogênica da bactéria causadora da gangrena gasosa. A bactéria anaeróbia altamente patogênica, *Clostridium perfringens*, é responsável pela gangrena gasosa, uma doença na qual a estrutura dos tecidos é destruída. Essa bactéria secreta uma enzima que catalisa eficientemente a hidrólise da ligação peptídica indicada na seqüência:

$$\text{—X—Gly—Pro—Y—} \xrightarrow{H_2O} \text{—X—COO}^- + H_3\overset{+}{N}\text{—Gly—Pro—Y—}$$

onde X e Y são quaisquer dos 20 aminoácidos naturais. Como a secreção dessa enzima contribui para o potencial de invasão dessa bactéria nos tecidos humanos? Por que essa enzima não afeta a própria bactéria?

9. O número de cadeias polipeptídicas em proteínas oligoméricas. Uma amostra (660mg) de uma proteína oligomérica de M_r 132.000 foi tratada com excesso de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (reagente de Sanger), em condição levemente alcalina, até que a reação química fosse completada. As ligações peptídicas da proteína foram hidrolisadas completamente por aquecimento em HCl concentrado. O hidrolisado, quando analisado, continha 5,5mg do seguinte composto:



Entretanto, não foi possível identificar nenhum outro derivado 2,4-dinitrofenil de grupos α-amino de outros aminoácidos.

(a) Explique por que essa informação pode ser usada para determinar o número de cadeias polipeptídicas em uma proteína oligomérica.

(b) Calcule o número de cadeias polipeptídicas nessa proteína.

(c) Que outras técnicas de análise protéica você poderia empregar para determinar se as cadeias polipeptídicas dessa proteína são semelhantes ou diferentes?

Bioquímica na internet

10. Modelagem protéica na internet. Pacientes que sofrem da doença de Crohn (uma doença inflamatória do intestino) submeteram-se a biópsias de suas mucosas intestinais na tentativa de identificar o agente causador da doença. Uma proteína foi identificada e ela era expressa em níveis mais altos em pacientes com a doença de Crohn do que em pacientes com outras inflamações intestinais distintas ou nos controles não afetados pela doença. A proteína foi isolada e a seguinte seqüência *parcial* de aminoácidos foi obtida:

EAELCPDRCI
SQRIQTNNNP
FQVTVRDPSG
TAELKICRVN
KEDIEVYFTG
VFRTPPYADP
SEPMEFQYLP
SIMKKSPFSG
VPKPAPQPYP
HSFQNLGIQC
FQVPIEEQRG
RPLRLPPVLP
RNSGSCLGGD
PGWEARGSFS
SLQAPVRVSM
DTDDRHRIEE
PTDPRPPPRR
VKKRDLEQAI
DYDLNAVRLC
HPIFDNRAPN
EIFLLCDKVQ
QADVHRQVAI
QLRRPSDREL
KRKRTYETFK
IAVPSRSSAS

(a) Você pode identificar essa proteína utilizando um banco de dados de proteínas na internet. Alguns bons locais para iniciar incluem o PIR — "International Protein Sequence Database" (Banco de Dados Internacional de Seqüências de Proteínas), a "Structural Classification of Proteins" (Classificação Estrutural de Proteínas; SCOP), e o Prosite. Para obter as URLs atuais desses e de outros sites de bancos de dados de proteínas, utilize um mecanismo de busca da internet ou vá para o site de *Principles of Biochemistry*, 3/e em http://www.worthpublishers.com/lehninger. Nesses sites, siga os links para localizar as ferramentas de comparações de seqüências. Digite cerca de 30 resíduos da seqüência protéica no campo apropriado de buscas e submeta-o a análise. O que essa análise nos diz sobre a identidade da proteína?

(b) Experimente utilizar partes diferentes da seqüência de aminoácidos da proteína. Você obtém sempre os mesmos resultados?

(c) Diversos sites da Web fornecem informações sobre a estrutura tridimensional das proteínas. Encontre informações sobre a estrutura secundária, terciária e quaternária da proteína utilizando sites de banco de dados como o "Protein Data Bank" (Banco de Dados de Proteínas, PDB) ou o SCOP.

(d) No decorrer de suas buscas na Web tente encontrar informações sobre a função celular dessa proteína.

CAPÍTULO 7

Funções das Proteínas

O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é parte importante para a compreensão de como ela funciona. Entretanto, a estrutura mostrada por meio de um desenho de duas dimensões é ilusoriamente estática. As proteínas são moléculas dinâmicas cujas funções dependem, quase invariavelmente, das interações com outras moléculas, e essas interações são influenciadas de maneira fisiologicamente importante por mudanças da conformação da proteína, por vezes sutis, por vezes consideráveis.

Neste capítulo, analisaremos como as proteínas interagem com outras moléculas e como suas interações estão relacionadas à estrutura dinâmica das proteínas. É difícil ressaltar demais a importância das interações moleculares para a função protéica. No Capítulo 6, vimos que a função das proteínas fibrosas como elementos estruturais das células e tecidos depende das interações quaternárias estáveis e de longa duração entre cadeias polipetídicas idênticas. Como veremos neste capítulo, as funções de muitas outras proteínas envolvem interações como uma variedade de diferentes moléculas. A maioria dessas interações é transitória, apesar de elas poderem constituir a base de processos fisiológicos complexos, tais como transporte de oxigênio, função imune e contração muscular, tópicos que examinaremos de modo detalhado neste capítulo. As proteínas que executam esses processos ilustram os seguintes princípios básicos das funções protéicas, com algumas das quais você já se familiarizou no capítulo anterior:

- As funções de muitas proteínas envolvem a ligação reversível com outras moléculas. Uma molécula que se liga reversivelmente a uma proteína é denominada **ligante**. Um ligante pode ser qualquer tipo de molécula, incluindo outra proteína. A natureza transitória das interações proteína-ligante é essencial para a vida, pois permite que um organismo possa responder a mudanças ambientais e metabólicas de maneira rápida e reversível.
- Um ligante combina-se a um sítio particular da proteína denominado **sítio de ligação**, que é complementar ao ligante em tamanho, forma, carga e caráter hidrofílico ou hidrofóbico. Além disso, essa interação é específica: a proteína pode discriminar entre os milhares de moléculas diferentes de seu meio ambiente e se combinar, seletivamente, somente a uma particular ou a algumas dessas. Uma dada proteína pode ter sítios de ligação distintos para vários ligantes diferentes. Essas interações moleculares específicas são cruciais para a manutenção do alto grau de ordem de um sistema vivo. (Esta discussão exclui a ligação da água, que pode interagir fracamente e de modo inespecífico com muitas partes de uma proteína. No Capítulo 8, consideraremos a água como um ligante específico para muitas enzimas.)
- As proteínas são flexíveis. As mudanças de conformação podem ser sutis, refletindo vibrações moleculares e pequenos movimentos de resíduos de aminoácidos por toda a extensão da proteína. Algumas vezes, diz-se que uma proteína flexionada dessa maneira "respira". Mudanças da conformação também podem ser bastante dramáticas, com alguns segmentos extensos da proteína movendo-se até vários nanômetros. Em geral, mudanças específicas de conformação são essenciais para a função da proteína.
- Freqüentemente a ligação de uma proteína com o ligante está associada a uma mudança da conformação da proteína, que torna o sítio de ligação mais complementar ao ligante, possibilitando uma ligação mais firme. A adaptação estrutural que ocorre entre a proteína e o ligante é denominada **ajuste induzido.**
- Em uma proteína multimérica, uma mudança da conformação em uma subunidade freqüentemente influencia a conformação de outras subunidades.
- As interações entre ligantes e proteínas podem ser reguladas, em geral, por interações específicas com um ou mais ligantes adicionais. Esses outros ligantes podem causar mudanças de conformação da proteína que interferem na ligação do primeiro ligante.

As enzimas representam um caso especial da função das proteínas. As enzimas ligam-se a outras moléculas e as transformam quimicamente — elas catalisam reações. As moléculas sobre as quais as enzimas atuam são denominadas **substratos** da reação, e não ligantes, e o sítio de ligação-ligante é denominado **sítio catalítico** ou **sítio ativo**. Neste capítulo daremos ênfase às funções não-catalíticas das proteínas. No Capítulo 8 será abordada a catálise por enzimas, um tema central da Bioquímica. Você verá que os temas deste capítulo — ligação, especificidade e mudanças de conformação — continuam no capítulo seguinte, com o acréscimo do tópico das proteínas funcionando como reagentes nas transformações químicas.

Ligação Reversível de uma Proteína com um Ligante: Proteínas Ligadoras de Oxigênio

A mioglobina e a hemoglobina são talvez as proteínas mais estudadas e mais bem compreendidas. Elas foram as primeiras proteínas cuja estrutura tridimensional foi determinada, e nosso conhecimento sobre a mioglobina e a hemoglobina resulta do trabalho de milhares de bioquímicos, durante várias décadas. Além disso, elas ilustram quase todos os aspectos do principal processo bioquímico: a ligação reversível de um ligante a uma proteína. Esse modelo clássico da função protéica esclarecerá muito sobre como as proteínas funcionam.

O oxigênio pode ligar-se a um grupo prostético heme

O oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas (veja Tabela 4-3) e não pode ser transportado para os tecidos em quantidades suficientes se estiver simplesmente dissolvido no plasma sangüíneo. Além disso, a difusão do oxigênio pelos tecidos é ineficiente em distâncias maiores que alguns milímetros. A evolução dos animais multicelulares dependeu da evolução de proteínas capazes de transportar e armazenar oxigênio. Entretanto, nenhuma das cadeias laterais das proteínas é adequada para a ligação reversível de moléculas de oxigênio. Esse papel é desempenhado por certos metais de transição, entre os quais o ferro e o cobre, que possuem uma forte tendência para ligar oxigênio. Os organismos multicelulares tiram proveito das propriedades desses metais, mais comumente do ferro, para transportar o oxigênio. Entretanto, o ferro livre favorece a formação de espécies de oxigênio altamente reativas, como os radicais hidroxila, que podem danificar o DNA e outras macromoléculas. Por isso, o ferro usado pelas células está ligado a estruturas que o seqüestram e/ou o tornam menos reativo. Nos organismos multicelulares — aqueles nos quais o ferro, com sua capacidade de transportar oxigênio, precisa ser transportado por longas distâncias —, o ferro está, com freqüência, incorporado a um grupo prostético ligado a uma proteína, denominado **heme**. (Um grupo prostético é um composto associado de modo permanente a uma proteína e que contribui para a função dessa proteína.)

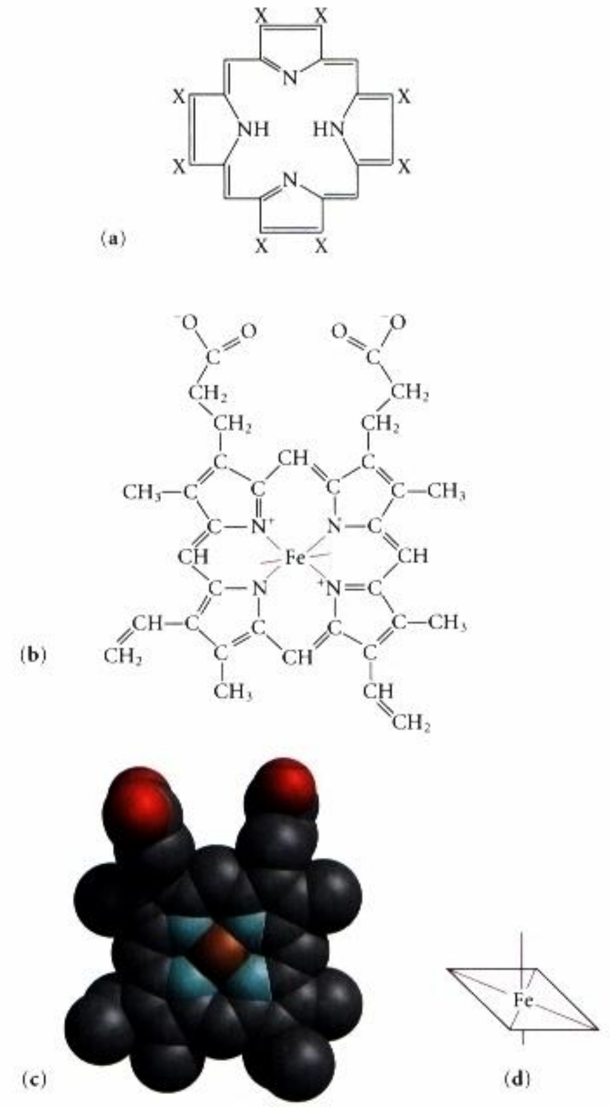


Figura 7-1 – Heme. O grupo heme está presente na mioglobina, na hemoglobina e em muitas outras proteínas, denominadas hemoproteínas. O heme é constituído por uma estrutura orgânica complexa em anel, a protoporfirina IX, à qual se liga um átomo de ferro em estado ferroso (Fe^{2+}). As porfirinas, das quais a protoporfirina é apenas um exemplo, são constituídas por quatro anéis pirrólicos ligados por pontes meteno **(a)**, com substituições em uma ou mais posições indicadas por X. Duas representações de heme são mostradas em (**b**) e (**c**). O átomo de ferro do heme tem seis ligações de coordenação: quatro no plano do sistema de anel da porfirina e a ele ligadas, e duas perpendiculares a esse sistema (**d**).

O heme é constituído por uma complexa estrutura orgânica em anel, a **protoporfirina**, à qual está ligado um único átomo de ferro em estado ferroso (Fe^{2+}) (Fig. 7-1). O átomo de ferro tem seis ligações de coordenação, quatro com átomos de nitrogênio, que fazem parte do **sistema do anel plano da porfirina**, e duas perpendiculares à porfirina. Os átomos de nitrogênio coordenados (que têm um carater de doadores de elétrons) ajudam a impedir a conversão do ferro do heme para o estado férrico (Fe^{3+}). No estado Fe^{2+}, o ferro liga o oxigênio de forma reversível; no estado Fe^{3+}, ele não liga o oxigênio. O heme é encontrado em muitas proteínas transportadoras de oxigênio, assim como em algumas proteínas, tais como os citocromos, que participam das reações de oxidorredução, ou seja, de transferência de elétrons (Capítulo 19).

Nas moléculas de heme livres, a reação do oxigênio em uma das duas ligações "abertas" do ferro (perpendiculares ao plano da molécula da porfirina, acima e abaixo) pode resultar em uma conversão irreversível de Fe^{2+} em Fe^{3+}. Nas proteínas que contêm ferro, essa reação é impedida, pois o heme está seqüestrado profundamente dentro da estrutura da proteína, onde o acesso às duas ligações de coordenação disponíveis é bloqueado. Uma dessas duas ligações de coordenação é ocupada por um nitrogênio da cadeia lateral de um resíduo His. A outra é o sítio de ligação do oxigênio molecular (O_2) (Fig. 7-2). Quando o oxigênio se liga, as propriedades eletrônicas do ferro do heme mudam; isso determina a mudança da cor arroxeada do sangue venoso com pouco oxigênio para o vermelho-brilhante do sangue arterial, rico em oxigênio. Algumas moléculas pequenas, como o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO), formam ligações de coordenação com o ferro do heme com maior afinidade do que o O_2. Quando uma molécula de CO se liga ao heme, o O_2 fica excluído, razão pela qual o CO é altamente tóxico para os organismos aeróbicos. Ao envolverem e seqüestrarem o heme, as proteínas ligadoras de oxigênio dificultam o acesso ao ferro do heme de CO e de outras pequenas moléculas.

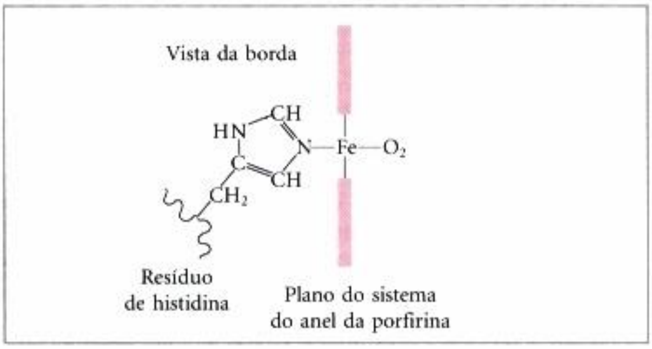


Figura 7-2 – O grupo heme visto lateralmente. Esta representação mostra as duas ligações de coordenação do Fe^{2+} perpendiculares ao plano do sistema do anel da porfirina. Uma destas ligações é ocupada por um resíduo His, algumas vezes denominado de His proximal. A outra é o sítio de ligação para o oxigênio. As quatro ligações restantes ficam no plano do sistema do anel da porfirina e estão ligadas a esse sistema.

A mioglobina tem um único sítio de ligação para o oxigênio

A mioglobina (M_r 16.700; abreviação Mb) é uma proteína relativamente simples, capaz de ligar oxigênio, encontrada em quase todos os mamíferos, basicamente no tecido muscular. Ela é particularmente abundante nos músculos de mamíferos que mergulham tais como as focas e as baleias que precisam armazenar oxigênio suficiente para mergulhos prolongados no mar. Proteínas muito semelhantes à mioglobina estão amplamente distribuídas na natureza e ocorrem até mesmo em alguns organismos unicelulares. A mioglobina armazena oxigênio para os períodos nos quais há aumento da necessidade de energia, promovendo sua distribuição para os tecidos que necessitam de oxigênio.

A mioglobina é um polipeptídeo constituído por uma única cadeia com 153 resíduos de aminoácidos e uma única molécula de heme. Ela é típica de uma família de proteínas denominadas **globinas**, as quais possuem estruturas primárias e terciárias semelhantes. O polipeptídeo é constituído por oito segmentos α-helicoidais ligados por curvaturas (Fig. 7-3). Cerca de 78% dos resíduos de aminoácidos dessa proteína se encontram nessas α-hélices.

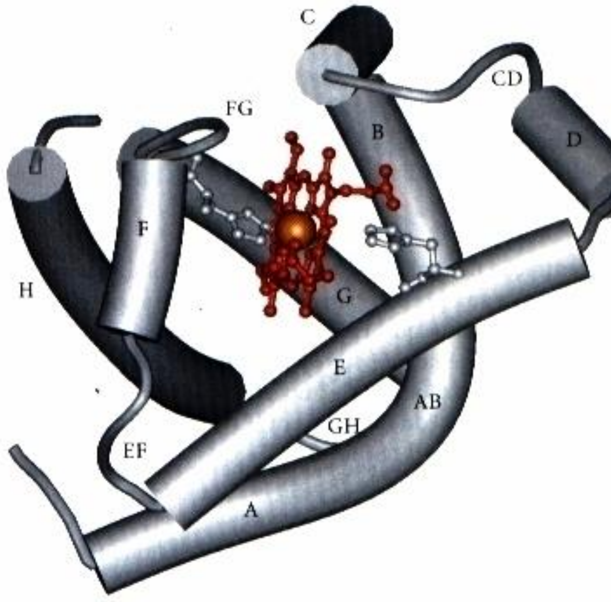


Figura 7-3 – A estrutura da mioglobina. Os oito segmentos α-helicoidais (mostrados aqui como cilindros) são denominados de A a H. Os resíduos não-helicoidais das curvaturas que os unem são denominados AB, CD, EF, e assim por diante, indicando os segmentos ligados por elas. Algumas curvaturas, inclusive BC e DE, são abruptas e não contêm nenhum resíduo; geralmente estes não são rotulados. (O segmento curto visível entre D e E é um artefato da representação feita por computador.) O heme está ligado dentro de uma fenda constituída principalmente pelas hélices E e F, apesar de resíduos de aminoácidos de outros segmentos da proteína também contribuírem para sua formação.

Qualquer discussão mais detalhada sobre as funções das proteínas envolve, inevitavelmente, a estrutura protéica. Nosso tratamento da mioglobina será facilitado pela introdução de algumas convenções estruturais peculiares às globinas. Como mostra a Figura 7-3, os segmentos helicoidais são denominados de A a H. Um resíduo de aminoácido individual pode ser designado de acordo com sua posição na seqüência dos aminoácidos, ou por sua localização na seqüência de um determinado segmento α-helicoidal. Por exemplo, o resíduo His coordenado ao heme da mioglobina, His^{93} (o 93º resíduo de aminoácido a partir da extremidade aminoterminal da seqüência do polipeptídeo), também é denominado His F8 (o 8º resíduo da α-hélice F). As curvaturas da estrutura são denominadas AB, CD, EF, e assim por diante, refletindo os segmentos α-helicoidais interligados por elas.

As interações proteína-ligante podem ser descritas quantitativamente

A função da mioglobina depende da capacidade da proteína não apenas de ligar o oxigênio, mas também de ser capaz de liberá-lo quando e onde ele se fizer necessário. Em Bioquímica, freqüentemente, a função gira em torno de uma interação reversível proteína-ligante desse tipo. Por isso, uma descrição quantitativa dessa interação constitui parte central de muitas pesquisas bioquímicas.

Geralmente, a ligação reversível de uma proteína (P) a um ligante (L) pode ser descrita por uma **expressão de equilíbrio** simples:

$$\text{P} + \text{L} \rightleftharpoons \text{PL} \tag{7-1}$$

Esta reação se caracteriza por uma constante de equilíbrio K_a, de tal maneira que

$$K_a = \frac{[\text{PL}]}{[\text{P}][\text{L}]} \tag{7-2}$$

O termo K_a é uma **constante de associação** (não confundir com o K_a que indica a constante de dissociação de um ácido, veja pág. 76). A constante de associação constitui uma dimensão da afinidade do ligante L pela proteína. K_a tem unidades de M^{-1}, um valor mais alto de K_a que corresponde a uma maior afinidade do ligante pela proteína. O rearranjo da Equação 7-2 mostra que o quociente entre a proteína ligada e a proteína livre é diretamente proporcional à concentração do ligante livre:

$$K_a[\text{L}] = \frac{[\text{PL}]}{[\text{P}]} \tag{7-3}$$

Quando a concentração do ligante é muito maior do que a concentração dos sítios de ligação para o ligante, a associação do ligante à proteína não muda de modo considerável a concentração de ligante livre (não-ligado) — isto é, [L] permanece constante. De modo geral, essa condição se aplica à maioria dos ligantes que se ligam a proteínas nas células e simplifica nossa descrição do equilíbrio de ligação. Portanto, podemos considerar o equilíbrio de ligação sob o ponto de vista da fração, θ (teta), de ligante-sítios de ligação da proteína ocupados pelo ligante:

$$\theta = \frac{\text{sítios de ligação ocupados}}{\text{total de sítios de ligação}} = \frac{[\text{PL}]}{[\text{PL}] + [\text{P}]} \tag{7-4}$$

Substituindo K_a [L] [P] por [PL] (veja Eq. 7-3) e rearranjando os termos obtemos:

$$\theta = \frac{K_a[\text{L}][\text{P}]}{K_a[\text{L}][\text{P}] + [\text{P}]} = \frac{K_a[\text{L}]}{K_a[\text{L}] + 1} = \frac{[\text{L}]}{[\text{L}] + \frac{1}{K_a}} \tag{7-5}$$

O termo K_a pode ser determinado locando θ *versus* concentração de ligante livre, [L] (Fig. 7-4a). Qualquer equação da forma $x = y/(y + z)$ descreve uma hipérbole, e, dessa maneira, verifica-se que θ é uma função hiperbólica de [L]. Quando [L] aumenta, a fração de sítios de ligação ocupados tende para a saturação de maneira assintótica. A [L], na qual metade dos sítios de ligação de ligante está ocupada (em θ = 0,5), corresponde a $1/K_a$.

Algumas vezes, de maneira intuitiva, é mais simples usar a **constante de dissociação, K_d**, que é a recíproca de K_a ($K_d = 1/K_a$) e dada em unidades de concentração molar (M). K_d é a constante de equilíbrio para a liberação do ligante. As expressões relevantes passam para:

$$K_d = \frac{[\text{P}][\text{L}]}{[\text{PL}]} \tag{7-6}$$

$$[\text{PL}] = \frac{[\text{P}][\text{L}]}{K_d} \tag{7-7}$$

$$\theta = \frac{[\text{L}]}{[\text{L}] + K_d} \tag{7-8}$$

Quando [L] é igual a K_d, a metade dos sítios de ligação de ligantes está ocupada. Quando [L] é menor do que K_d, poucos ligantes se associam à proteína. Para que 90% dos sítios de ligação

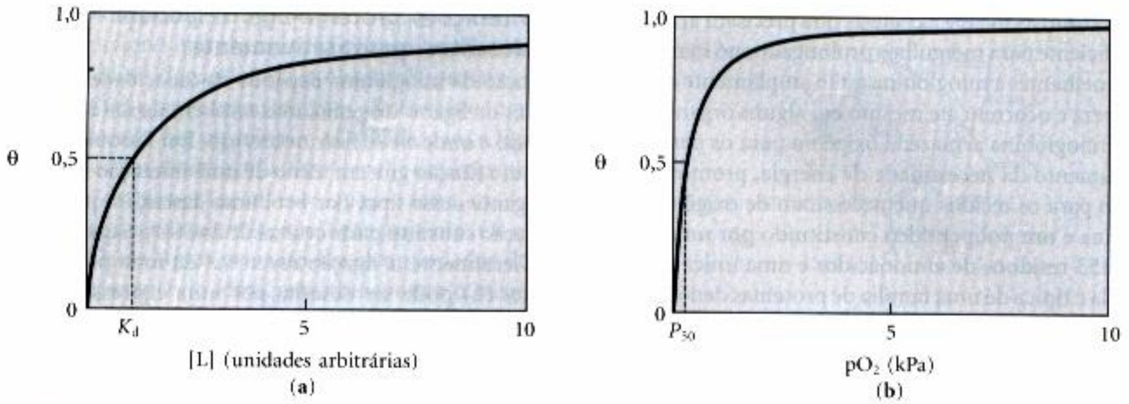


Figura 7-4 – Representação gráfica da ligação dos ligantes. A fração ligante-sítios de ligação ocupados, θ, está locada contra a concentração de ligante livre. Ambas as curvas são hipérboles retangulares. (**a**) Curva hipotética de ligação para um ligante L. A [L] na qual metade dos sítios de ligação de ligantes disponíveis é equivalente a $1/K_a$, ou K_d. A curva tem uma assintótica horizontal (não mostrada), com $\theta = 1$, e uma assintótica vertical (não mostrada), com $[L] = -1/K_a$. (**b**) Curva que descreve a ligação do oxigênio à mioglobina. A pressão parcial de O_2 no ar sobre a solução é expressa em termos de quilopascais (kPa). O oxigênio liga-se firmemente à mioglobina com P_{50} de somente 0,26kPa.

de ligantes estejam ocupados, [L] deve ser nove vezes maior do que K_d. Na prática, K_d é usada com muito mais freqüência do que K_a para expressar a afinidade de uma proteína pelo ligante. Note que um valor mais baixo de K_d corresponde a uma maior afinidade do ligante pela proteína. Toda essa matemática pode ser reduzida a afirmativas bem simples: K_d é a concentração molar do ligante na qual metade dos sítios de ligação do ligante está ocupada. Nesse ponto, diz-se que a proteína alcançou meia saturação com relação à ligação do ligante. Quanto maior for a força de ligação de uma proteína para um ligante, menor será a concentração do ligante necessária para que metade dos sítios de ligação esteja ocupada, e, portanto, um valor menor de K_d. Algumas constantes de dissociação representativas são apresentadas na Tabela 7-1.

Tabela 7-1 – Algumas constantes de dissociação de proteínas

Proteína	Ligante	K_d (M)[*]
Avidina (clara do ovo)[†]	Biotina	1×10^{-15}
Receptor da insulina (humano)	Insulina	1×10^{-10}
Imunoglobulina anti-HIV (humana)[‡]	gp41 (proteína da superfície do HIV-1)	4×10^{-10}
Proteína ligante de níquel (*E. coli*)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulina (rato)[§]	Ca^{2+}	3×10^{-6} 2×10^{-5}

[*] O valor de uma constante de dissociação registrada só é válido para as condições de solução particulares sob as quais ela foi medida. Os valores K_d para uma interação proteína-ligante podem variar em muitas ordens de grandeza, em conseqüência de variações na concentração salina da solução, pH, ou outros fatores ambientais.

[†] A interação da avidina com a biotina, um co-fator enzimático, é uma das mais fortes interações bioquímicas não-covalentes conhecidas.

[‡] Essa imunoglobulina foi isolada durante a tentativa para desenvolver uma vacina contra o HIV. As imunoglobulinas (descritas mais adiante neste capítulo) são altamente variáveis, e o K_d registrado aqui não deve ser considerado característico de todas as imunoglobulinas.

[§] A calmodulina tem quatro sítios de ligação para o cálcio. Os valores mostrados refletem os sítios de ligação com a afinidade mais alta e a mais baixa observadas em um conjunto de medidas.

A ligação do oxigênio à mioglobina segue os padrões discutidos anteriormente, mas, como o oxigênio é um gás, precisamos fazer alguns pequenos ajustes nas equações. Na Equação 7-8, podemos simplesmente substituir a concentração do oxigênio dissolvido pela [L] para obtermos:

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \qquad (7\text{-}9)$$

Do mesmo modo que para todos os ligantes, K_d é igual à $[O_2]$, na qual metade dos sítios de ligação dos ligantes disponíveis está ocupada, ou $[O_2]_{0,5}$. A Equação 7-9 passa a ser

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \qquad (7\text{-}10)$$

A concentração de uma substância volátil em solução sempre é proporcional à sua pressão parcial na fase gasosa sobre a solução. Em experimentos que usam oxigênio como ligante, é a pressão parcial do oxigênio, pO_2, que varia, pois é mais fácil medi-la do que a concentração do oxigênio dissolvido. Quando definimos a pressão parcial do oxigênio em $[O_2]_{0,5}$ como P_{50}, a substituição na Equação 7-10 resulta em

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \qquad (7\text{-}11)$$

Uma curva da ligação da mioglobina que relaciona θ à pO_2 é mostrada na Figura 7-4b.

A estrutura da proteína afeta a maneira pela qual os ligantes se ligam

Raramente a ligação de um ligante a uma proteína é tão simples como a equação apresentada anteriormente parece indicar. A estrutura da proteína afeta muito a interação e, freqüentemente, é acompanhada por mudanças da conformação. Por exemplo, a intensidade com que o heme livre se liga a seus vários ligantes fica alterada quando o heme passa a ser um componente da mioglobina. O CO liga-se às moléculas de heme livres com afinidade 20.000 vezes maior do que o O_2 (a K_d ou P_{50} para a ligação CO é mais de 20.000 vezes menor do que a do O_2), mas liga-se somente cerca de 200 vezes melhor do que quando o heme está enclausurado na mioglobina. Essa diferença é explicada, em parte, pelo impedimento estérico. Quando o O_2 se liga ao heme livre, o eixo da molécula do oxigênio fica posicionado de modo a formar um ângulo com a ligação Fe—O (Fig. 7-5a). Por outro lado, quando o CO se liga ao heme livre, os átomos de Fe, C e O se dispõem em linha reta (Fig. 7-5b). Em ambos os casos, a ligação reflete a geometria das orbitais híbridas de cada ligante. Na mioglobina, a His^{64} (His E7), no lado do heme que liga o O_2, fica distante demais para se coordenar com o ferro do heme, mas ela interage com um ligante associado ao heme. Esse resíduo, denominado *His distal*, não influencia a ligação de O_2 (Fig. 7-5c), mas pode impedir a ligação linear do CO, o que poderia explicar a diminuição da ligação de CO ao heme da mioglobina (e hemoglobina). Esse efeito

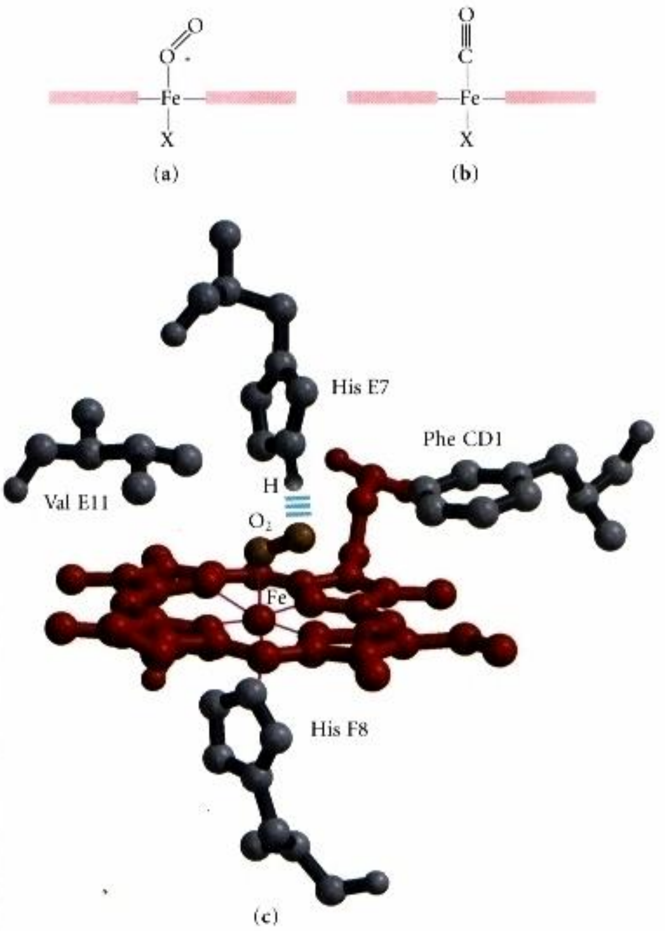


Figura 7-5 – Efeitos estéricos sobre a ligação dos ligantes ao heme da mioglobina. (**a**) O oxigênio liga-se ao heme com o eixo do O_2 formando um ângulo, uma conformação de ligação acomodada de maneira favorável pela mioglobina. (**b**) O monóxido de carbono liga-se ao heme livre com o eixo do CO perpendicular ao plano do anel de porfirina. A ligação do CO ao heme da mioglobina é forçada a assumir um pequeno ângulo porque a disposição perpendicular é estericamente bloqueada pela His E7, a His distal. Esse efeito enfraquece a ligação do CO com a mioglobina. (**c**) Outra visão mostrando a disposição dos resíduos dos aminoácidos-chave em torno do heme da mioglobina. O O_2 está ligado por hidrogênio à His distal, His E7 (His^{64}), facilitando ainda mais a ligação do O_2.

sobre a ligação do CO é fisiologicamente importante, pois o CO é um subproduto gerado no metabolismo celular. Outros fatores, ainda não bem definidos, também parecem dificultar a interação do heme com o CO nessas proteínas.

A ligação de O_2 ao heme da mioglobina também depende de movimentos moleculares, ou "respiração", da estrutura da proteína. A molécula do heme fica imersa em alças polipeptídicas, sem que haja uma via direta para o oxigênio passar da solução circundante para o sítio combinatório do ligante. Se a proteína fosse rígida, o O_2 poderia não entrar ou sair da fenda do heme em uma velocidade mensurável. Entretanto, a rápida flexão molecular das cadeias laterais de aminoácidos cria cavidades transitórias na estrutura da proteína, e, evidentemente, o O_2 segue seu caminho para dentro e para fora, migrando por essas cavidades. Simulações por computador das rápidas flutuações estruturais da mioglobina sugerem que existem vários desses caminhos. Um caminho importante é dado pela rotação da cadeia lateral do His distal (His^{64}), uma ocorrência na escala de tempo da ordem de nanossegundos (10^{-9}s). Até mesmo mudanças de conformação singelas podem interferir com a atividade da proteína.

O oxigênio do sangue é transportado pela hemoglobina

Quase todo o oxigênio transportado pelo sangue total dos animais é levado pela hemoglobina dos eritrócitos (glóbulos vermelhos). Os eritrócitos humanos normais são pequenos discos (6 a 9μm de diâmetro), bicôncavos. Eles se originam de células-tronco precursoras denominadas **hemocitoblastos**. No processo de maturação, a célula-tronco produz células filhas que sintetizam grandes quantidades de hemoglobina e finalmente perdem suas organelas intracelulares — núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Portanto, os eritrócitos são células incompletas, incapazes de se reproduzir e, nos seres humanos, destinadas a sobreviver por apenas 120 dias. Sua função principal é transportar hemoglobina dissolvida no citosol em concentração muito alta (~34% por peso).

No sangue arterial, que vai dos pulmões para os tecidos periféricos passando pelo coração, a hemoglobina tem uma saturação de oxigênio de cerca de 96%. No sangue venoso, que retorna para o coração, a hemoglobina tem uma saturação de cerca de 64%. Portanto, cada 100mL de sangue que passam pelos tecidos liberam cerca de um terço do oxigênio que transportam, ou seja, 6,5mL de O_2 gás, à pressão atmosférica e na temperatura corporal.

A mioglobina, com sua curva hiperbólica de ligação com o oxigênio (Fig. 7-4b), é relativamente insensível a pequenas mudanças na concentração do oxigênio dissolvido e, portanto, funciona bem como uma proteína armazenadora de oxigênio. A hemoglobina, com suas múltiplas subunidades e sítios ligadores de O_2, é mais adaptada para o transporte do oxigênio. Como veremos, as interações entre as subunidades de uma proteína multimérica podem favorecer uma resposta muito delicada a pequenas mudanças na concentração do ligante. As interações entre as subunidades da hemoglobina causam mudanças na conformação, que alteram a afinidade da proteína pelo oxigênio. A modulação da ligação do oxigênio torna possível à proteína transportadora de O_2 responder a mudanças na demanda de oxigênio pelos tecidos.

As subunidades da hemoglobina são estruturalmente semelhantes às da mioglobina

A hemoglobina (M_r 64.500; abreviação Hb) é grosseiramente esférica, com um diâmetro de aproximadamente 5,5nm. Ela é uma proteína tetramérica que contém quatro grupos prostéticos heme, cada um associado a uma cadeia polipeptídica. A hemoglobina do adulto contém dois tipos de globina, duas cadeias α (141 resíduos cada uma) e duas cadeias β (146 resíduos cada uma). Apesar de menos da metade dos resíduos de aminoácidos das seqüências de polipeptídeos das subunidades α e β ser idêntica, as estruturas tridimensionais dos dois tipos de subunidades são muito semelhantes. Além disso, suas estruturas são muito semelhantes às da mioglobina (Fig. 7-6), apesar de as seqüências de aminoácidos dos três polipeptídeos serem idênticas em somente 27 posições (Fig. 7-7). Todos os três polipeptídeos são membros da família de proteínas globina. A convenção de nomenclatura de hélice descrita para a mioglobina também é aplicada para os polipeptídeos da hemoglobina, exceto para a subunidade α que não possui a hélice D curta. O bolso ligante de hemoglobina é, em grande parte, constituído pelas hélices E e F.

A estrutura quaternária da hemoglobina tem como característica as fortes interações entre subunidades diferentes. A interface $\alpha_1\beta_1$ (e sua equivalente $\alpha_2\beta_2$) envolve mais de 30 resíduos e é suficientemente forte para mantê-las unidas; apesar de o tratamento brando da hemoglobina com a uréia causar a dissociação do tetrâmero em dímeros $\alpha\beta$, os dímeros permanecem intactos. A interface $\alpha_1\beta_2$ (e a $\alpha_2\beta_1$) envolve 19 resíduos (Fig. 7-8). As interações hidrofóbicas predominam nas interfaces, mas também participam muitas pontes de hidrogênio e alguns íons emparelhados (algumas vezes chamados de pontes salinas), cuja importância é discutida a seguir.

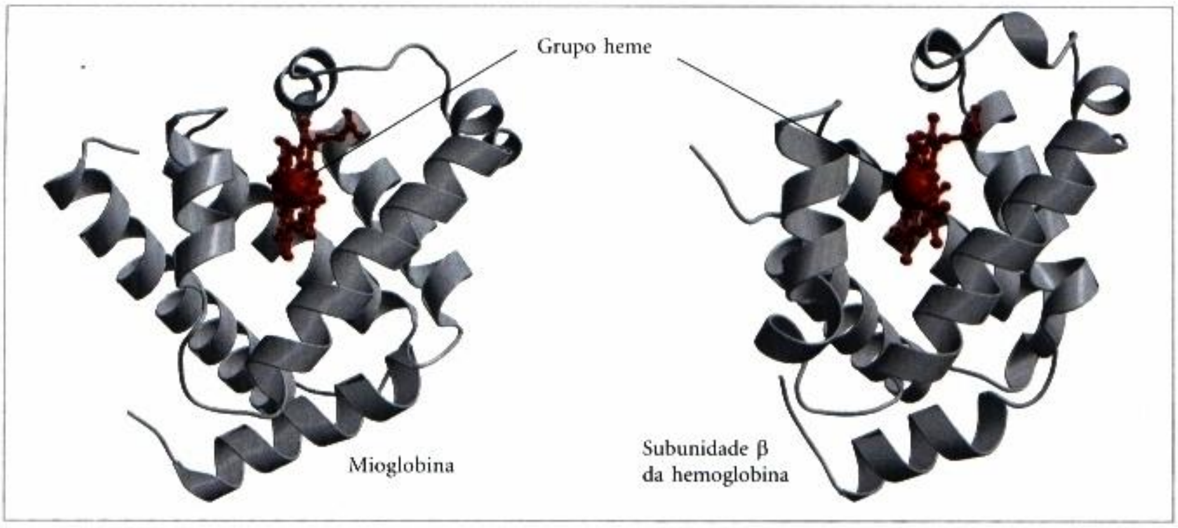
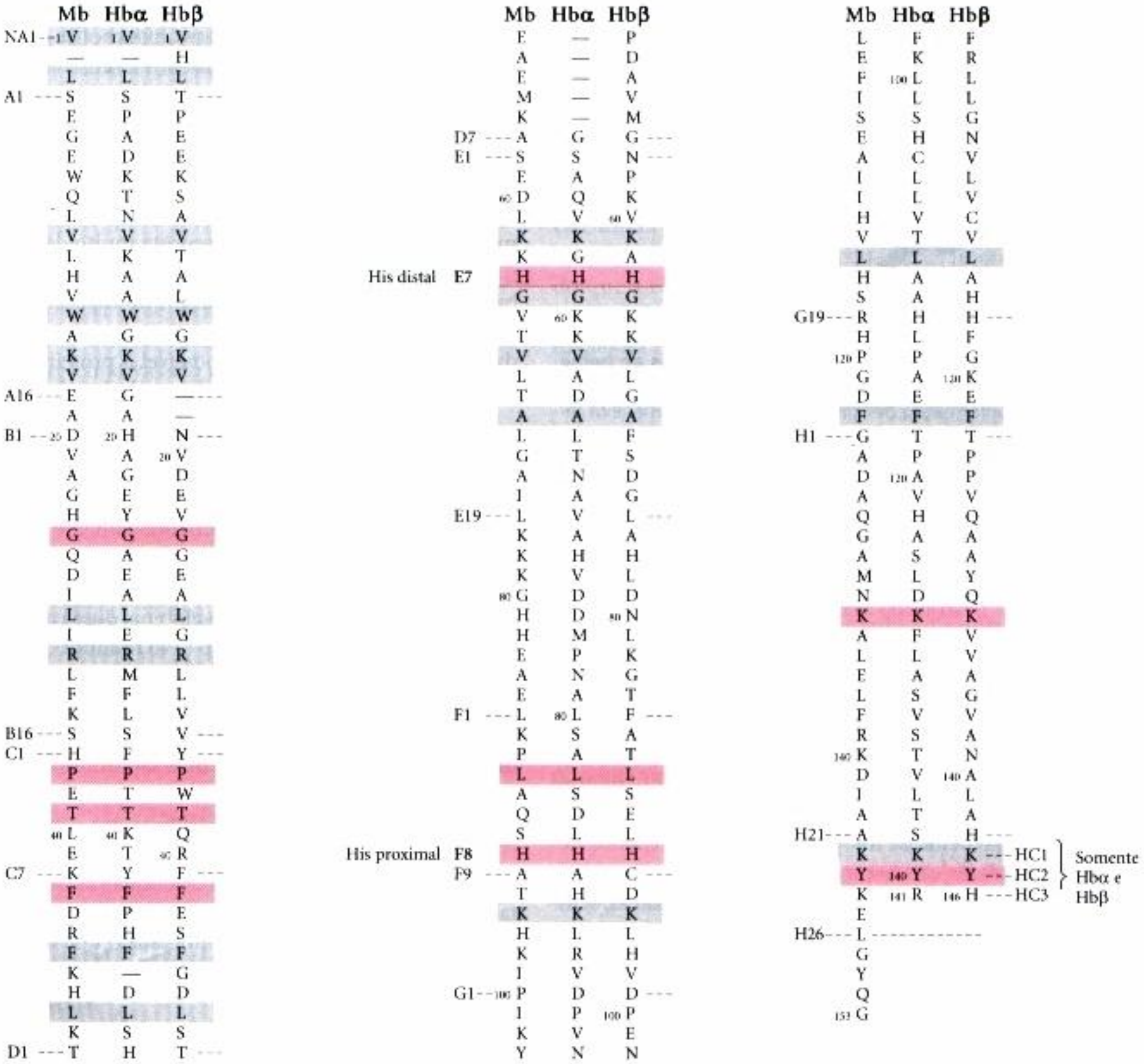


Figura 7-6 – Comparação das estruturas da mioglobina com a subunidade β da hemoglobina.



	Mb	Hbα	Hbβ		
NA1	1 V	1 V	1 V		
	—	—	H		
	L	L	L		
A1	S	S	T		
	E	P	P		
	G	A	E		
	E	D	E		
	W	K	K		
	Q	T	S		
	L	N	A		
	V	V	V		
	L	K	T		
	H	A	A		
	V	A	L		
	W	W	W		
	A	G	G		
	K	K	K		
	V	V	V		
A16	E	G	—		
	A	A	—		
B1	20 D	20 H	N		
	V	A	20 V		
	A	G	D		
	G	E	E		
	H	Y	V		
	G	G	G		
	Q	A	G		
	D	E	E		
	I	A	A		
	L	L	L		
	I	E	G		
	R	R	R		
	L	M	L		
	F	F	L		
	K	L	V		
B16	S	S	V		
C1	H	F	Y		
	P	P	P		
	E	T	W		
	T	T	T		
	40 L	40 K	Q		
	E	T	40 R		
C7	K	Y	F		
	F	F	F		
	D	P	E		
	R	H	S		
	F	F	F		
	K	—	G		
	H	D	D		
	L	L	L		
	K	S	S		
D1	T	H	T		
	E	—	P		
	A	—	D		
	E	—	A		
	M	—	V		
	K	—	M		
D7	A	G	G		
E1	S	S	N		
	E	A	P		
	60 D	Q	K		
	L	V	60 V		
	K	K	K		
	K	G	A		
His distal E7	H	H	H		
	G	G	G		
	V	60 K	K		
	T	K	K		
	V	V	V		
	L	A	L		
	T	D	G		
	A	A	A		
	L	L	F		
	G	T	S		
	A	N	D		
	I	A	G		
E19	L	V	L		
	K	A	A		
	K	H	H		
	K	V	L		
	80 G	D	D		
	H	D	80 N		
	H	M	L		
	E	P	K		
	A	N	G		
	E	A	T		
F1	L	80 L	F		
	K	S	A		
	P	A	T		
	L	L	L		
	A	S	S		
	Q	D	E		
	S	L	L		
His proximal F8	H	H	H		
F9	A	A	C		
	T	H	D		
	K	K	K		
	H	L	L		
	K	R	H		
	I	V	V		
G1	100 P	D	D		
	I	P	100 P		
	K	V	E		
	Y	N	N		
	L	F	F		
	E	K	R		
	F	100 L	L		
	I	L	L		
	S	S	G		
	E	H	N		
	A	C	V		
	I	L	L		
	I	L	V		
	H	V	C		
	V	T	V		
	L	L	L		
	H	A	A		
	S	A	H		
G19	R	H	H		
	H	L	F		
	120 P	P	G		
	G	A	120 K		
	D	E	E		
	F	F	F		
H1	G	T	T		
	A	P	P		
	D	120 A	P		
	A	V	V		
	Q	H	Q		
	G	A	A		
	A	S	A		
	M	L	Y		
	N	D	Q		
	K	K	K		
	A	F	V		
	L	L	V		
	E	A	A		
	L	S	G		
	F	V	V		
	R	S	A		
	140 K	T	N		
	D	V	140 A		
	I	L	L		
	A	T	A		
H21	A	S	H		
	K	K	K	HC1	
	Y	140 Y	Y	HC2	Somente Hbα e Hbβ
	K	141 R	146 H	HC3	
	E				
H26	L				
	G				
	Y				
	Q				
	153 G				

Figura 7-7 – Seqüências de aminoácidos da mioglobina de baleia e as cadeias α e β da hemoglobina humana. As linhas tracejadas marcam os limites da hélice. Para alinhar de maneira favorável as seqüências, precisam ser incorporadas pequenas interrupções em ambas as seqüências da Hb onde a freqüência de certos aminoácidos nas outras seqüências é mínima. Com exceção da hélice D, ausente de Hbα, esse alinhamento possibilita o uso de uma convenção que usa letras, o que dá ênfase às posições comuns dos resíduos de aminoácidos, os quais são idênticos em todas as três estruturas (sombreado em cinza). Os resíduos sombreados em vermelho estão presentes em todas as globinas conservadas. Note que uma designação comum, letra e número, dos aminoácidos em duas ou três estruturas diferentes não corresponde, necessariamente, a uma posição comum na seqüência linear de aminoácidos dos polipeptídeos. Por exemplo, o resíduo His distal é His E7 em todas as três estruturas, mas corresponde a His^{64}, His^{58} e His^{63} nas seqüências lineares de Mb, Hbα e Hbβ, respectivamente. Resíduos não-helicoidais nas porções amino e carboxiterminais, situados além do primeiro (A) e último (H) dos segmentos α-helicoidais, são denominados NA e HC, respectivamente.

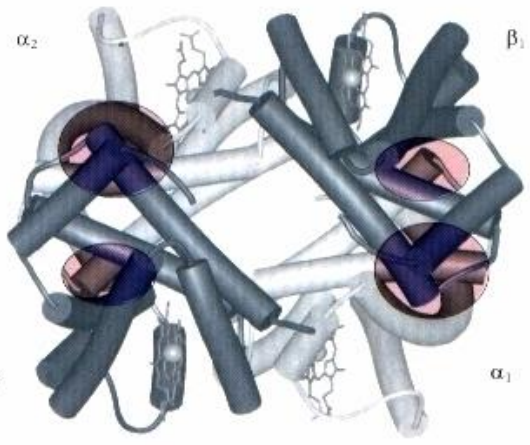


Figura 7-8 – Interações dominantes entre as subunidades da hemoglobina. Nesta representação, as subunidades α estão em cinza-claro e as subunidades β, mais escuras. As interações mais fortes entre subunidades, destacadas, ocorrem entre subunidades diferentes. Quando o oxigênio se liga, o contato $\alpha_1\beta_1$ muda pouco, mas há uma grande mudança no contato $\alpha_1\beta_2$, com o rompimento de vários íons emparelhados.

A hemoglobina passa por uma mudança estrutural com a ligação do oxigênio

A análise por raios X revelou duas conformações principais da hemoglobina: o **estado R** e o **estado T**. Apesar de o oxigênio ligar-se à hemoglobina em ambos os estados; no estado R, ele tem uma afinidade significativamente maior para a **hemoglobina**. A ligação com o oxigênio estabiliza o estado R. Experimentalmente, quando o oxigênio está ausente, o estado T é mais estável e, portanto, é a conformação predominante da **desoxiemoglobina.** Historicamente, as denominações T e R referiam-se a "tenso" e "relaxado", respectivamente, porque o estado T é estabilizado por um maior número de pares de íons, muitos dos quais ficam na interface $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_2\beta_1$) (Fig. 7-9). A ligação de O_2 a uma subunidade de hemoglobina no estado T desencadeia uma mudança da conformação para o estado R. Quando toda a proteína passa por esse processo de transição, a estrutura das subunidades individuais muda pouco, mas os pares de subunidades $\alpha\beta$, deslizam um pelo outro e fazem uma rotação, o que estreita a fenda entre as subunidades β (Fig. 7-10). Nesse processo, alguns dos pares de íons que estabilizam o estado T são rompidos e alguns novos são formados.

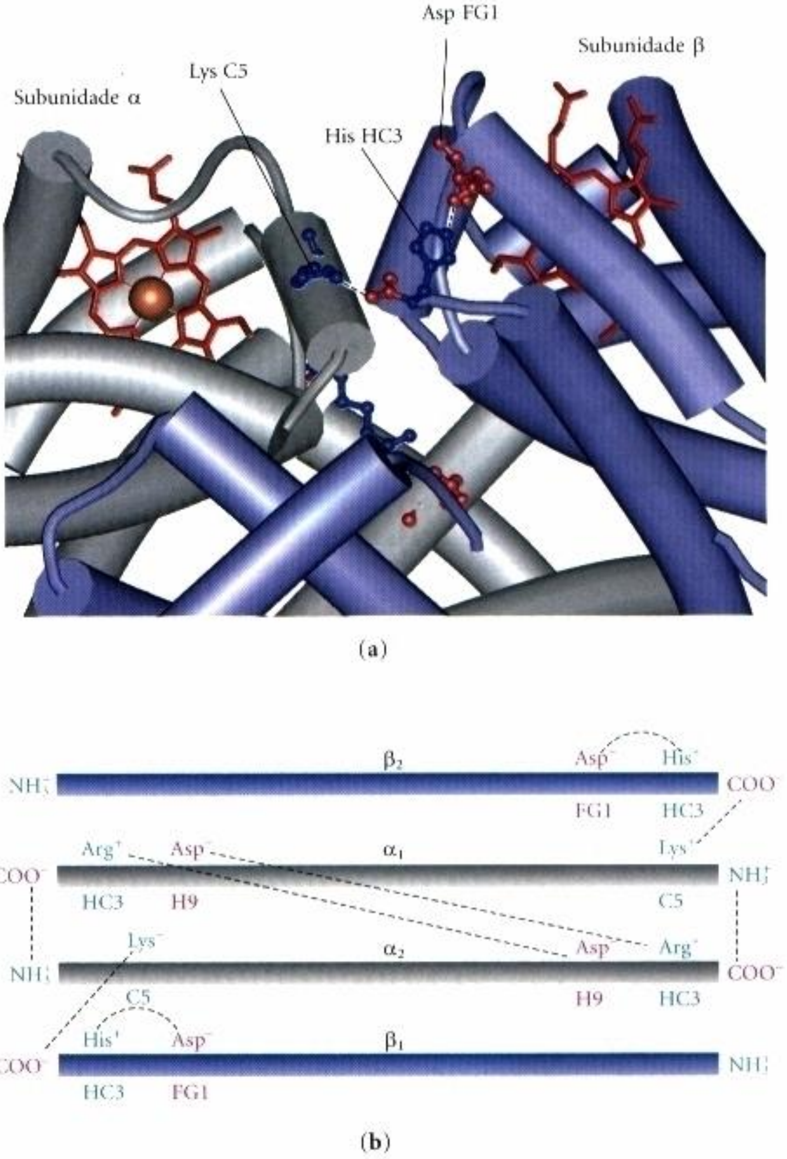


Figura 7-9 – Alguns dos pares de íons que estabilizam o estado T da desoxiemoglobina. (**a**) Vista de perto de uma parte de uma molécula de desoxiemoglobina no estado T. As interações entre os pares de íons His HC3 e Asp FG1 da subunidade α (em azul) e entre Lys C5 da subunidade β (em cinza) e o grupo α-carboxila de His HC3 da subunidade β são mostradas em linhas tracejadas. (Lembre-se de que HC3 é o resíduo carboxiterminal da subunidade β.) (**b**) As interações entre esses pares de íons e outros, não mostrados em (**a**), estão esquematizados nesta representação das cadeias polipeptídicas estendidas da hemoglobina.

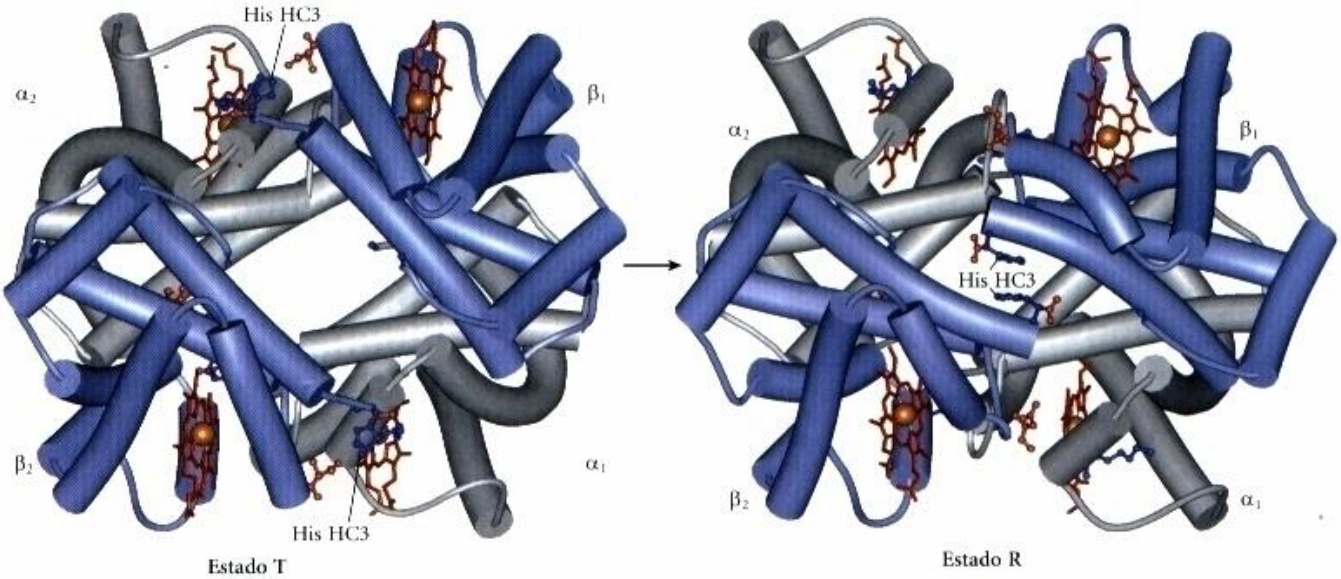
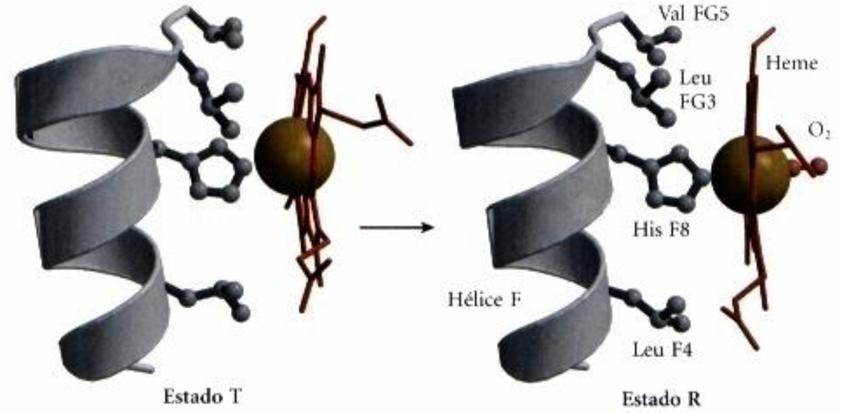


Figura 7-10 – Transição T ⟶ R. Nestas representações da desoxiemoglobina, como na Figura 7-9, as subunidades β estão em azul-claro e as subunidades α, em cinza. As cadeias laterais com carga positiva e as cadeias terminais envolvidas com pares de íons são mostradas em azul. Seus parceiros de carga negativa estão em rosa. O Lys C5 de cada subunidade α e o Asp FG1 de cada subunidade β são mostrados, mas não estão indicados (compare com a Fig. 7-9a). Note que a molécula tem uma orientação bem diferente da apresentada na Figura 7-9. A transição do estado T para o estado R muda substancialmente os pares de subunidades, afetando certos pares de íons. Mais proeminente, os residuos His HC3 do carboxiterminal das subunidades β, envolvidas com os pares de íons no estado T, no estado R fazem uma rotação em direção ao centro da molécula onde deixam de formar pares de íons. Outro resultado dramático da transição T ⟶ R é o estreitamento da fenda entre as subunidades β.

Figura 7-11 – Mudanças da conformação perto do heme da ligação O_2. O deslocamento da posição da hélice F, quando o heme se liga a O_2, é um dos ajustes que se acreditam desencadeiam a transição T ⟶ R.



Max Perutz propôs que a transição T ⟶ R é desencadeada por mudanças nas posições críticas das cadeias de aminoácidos que envolvem o heme. No estado T, a porfirina está levemente pregueada, levando o heme a fazer uma pequena protrusão sobre o lado His (His F8) proximal. A ligação de O_2 leva o heme a assumir uma conformação mais planar, mudando a posição do His proximal e a hélice F ligada (Fig. 7-11). Além disso, um resíduo Val da hélice E (Val E11) bloqueia parcialmente o heme no estado T e precisa deslocar-se para que o oxigênio se ligue (Fig. 7-10). Essas mudanças levam a ajustes dos pares de íons na interface $\alpha_1\beta_2$.

A hemoglobina liga-se ao oxigênio de modo cooperativo

A hemoglobina precisa ligar o oxigênio de maneira eficiente nos pulmões, onde o pO_2 é de cerca de 13,3kPa, e liberá-lo nos tecidos, onde o pO_2 é de cerca de 4kPa. A mioglobina, ou qualquer proteína que ligue oxigênio com uma curva de ligação hiperbólica, seria pouco eficiente para essa função, pela razão ilustrada na Figura 7-12. Uma proteína que ligasse O_2 com alta afinidade, ligá-lo-ia com eficiência nos pulmões, mas não o liberaria muito nos tecidos. Se a proteína ligasse oxigênio com uma afinidade suficientemente baixa para liberá-lo nos tecidos, ela não seria capaz de captar muito oxigênio nos pulmões.

A hemoglobina resolve esse problema passando por uma transição de um estado de baixa afinidade (o estado T) para um estado de alta afinidade (o estado R), à medida que aumenta o número de moléculas de O_2 ligadas. O resultado disso é que a hemoglobina tem uma curva de ligação híbrida, em forma de S, ou sigmóide, para o oxigênio (Fig. 7-12). Uma proteína com uma única subunidade com um único sítio de ligação do ligante é incapaz de produzir uma curva sigmóide de ligação — mesmo quando a ligação induza uma mudança da conformação —, porque cada molécula do ligante se liga de modo independente e não pode influenciar a ligação de outra molécula. Ao contrário, a ligação de O_2 às subunidades individuais da hemoglobina é capaz de alterar a afinidade de subunidades adjacentes pelo O_2. A primeira molécula de O_2 que interage com a desoxiemoglobi-

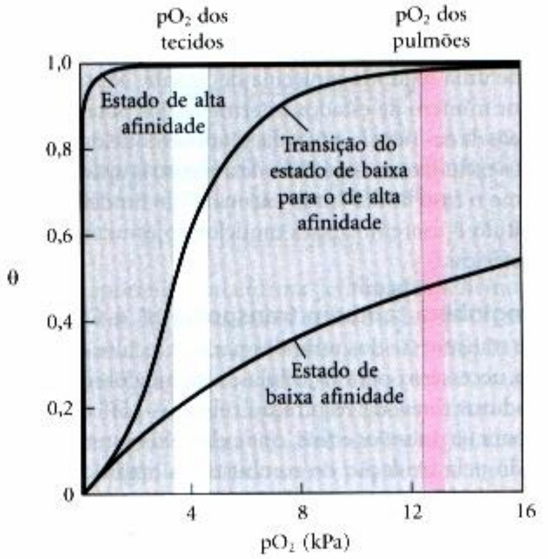


Figura 7-12 – Uma curva sigmóide (cooperativa) de ligação. Uma curva sigmóide de ligação pode ser considerada como uma curva híbrida refletindo uma transição de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade. A ligação cooperativa, representada por uma curva com formato sigmóide, torna a hemoglobina mais sensível a pequenas diferenças da concentração de O_2 entre os tecidos e os pulmões, o que possiblita à hemoglobina ligar oxigênio nos pulmões, onde o pO_2 é alto, e liberá-lo nos tecidos, onde o pO_2 é baixo.

na se liga fracamente, por ligar-se a uma subunidade no estado T. Entretanto, sua ligação leva a mudanças de conformação que são comunicadas a subunidades adjacentes, tornando mais fácil a ligação de moléculas de O_2 adicionais. Efetivamente, a transição T ⟶ R ocorre mais prontamente na segunda subunidade uma vez que O_2 tenha se ligado à primeira subunidade. A última (quarta) molécula de O_2 liga-se a um heme de uma subunidade que já está no estado R e, portanto, liga-se com muito maior afinidade do que a primeira molécula.

Uma **proteína alostérica** é aquela na qual a ligação de um ligante a um sítio influencia as propriedades de ligação de outro sítio da mesma proteína. O termo alostérico deriva do grego *allos*, "outro", e *stereos*, "sólido" ou "forma". As proteínas alostéricas são as que possuem "outras formas", ou conformações, induzidas pela ligação de ligantes chamados moduladores. As mudanças de conformação induzidas pelo(s) modulador(es) interconvertem formas mais ativas em menos ativas da proteína. Os moduladores das proteínas alostéricas são idênticos e podem ser inibidores ou ativadores. Quando o ligante normal e os moduladores são idênticos, a interação é denominada **homotrópica**. Quando o modulador é uma molécula que não o ligante normal, a interação é **heterotópica**. Algumas proteínas têm interações homotrópicas e heterotópicas.

A ligação cooperativa de um ligante a uma proteína multimérica, como observamos na ligação de O_2 à hemoglobina, é uma forma de ligação alostérica observada com freqüência em proteínas multiméricas. A ligação de um ligante influencia as afinidades de todos os sítios de ligação que permanecem sem ligação, e o O_2 pode ser considerado como um ligante normal e um ativador modulador homotrópico. Em cada subunidade existe apenas um sítio de ligação para o O_2, de maneira que os efeitos alostéricos que dão origem à cooperatividade são mediados por mudanças da conformação transmitidas de uma subunidade para outra por meio de interações subunidade-subunidade. Uma curva de ligação com formato sigmóide indica uma ligação cooperativa. Ela possibilita uma resposta muito mais sensível à concentração do ligante e é importante para a função de proteínas multissubunidades. O princípio do alosterismo extrapola para as enzimas reguladoras, como veremos no Capítulo 8.

A ligação cooperativa do ligante pode ser descrita de modo quantitativo

A ligação cooperativa do oxigênio com a hemoglobina foi analisada primeiro por Archibald Hill, em 1910. Para uma proteína com *n* sítios de ligação, a expressão de equilíbrio da Equação 7-1 torna-se

$$\mathrm{P} + n\mathrm{L} \rightleftharpoons \mathrm{PL}_n \qquad (7\text{-}12)$$

e a expressão para a constante de associação torna-se

$$K_a = \frac{[\mathrm{PL}_n]}{[\mathrm{P}][\mathrm{L}]^n} \qquad (7\text{-}13)$$

A expressão para θ (veja Eq. 7-8) é

$$\theta = \frac{[\mathrm{L}]^n}{[\mathrm{L}]^n + K_d} \qquad (7\text{-}14)$$

Rearranjando e tomando o log de ambos os lados, resulta

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{[\mathrm{L}]^n}{K_d} \qquad (7\text{-}15)$$

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log [\mathrm{L}] - \log K_d \qquad (7\text{-}16)$$

A Equação 7-16 é a **equação de Hill**, e um "plot" de log [θ/(1 – θ)] *versus* o log [L] é chamado **"plot" de Hill**. Com base na equação, o "plot" de Hill deveria ter uma inclinação de *n*. Entretanto, a inclinação determinada experimentalmente, na realidade, reflete não o número de sítios de ligação, mas o grau de interação entre eles. A inclinação do "plot" de Hill é, por isso, designada n_H, o **coeficiente de Hill**, que é uma medida do grau de cooperatividade. Quando n_H é igual a 1, a ligação do ligante não é cooperativa, uma situação que pode ocorrer até mesmo em uma proteína multiunidades quando não há comunicação entre subunidades. Um n_H maior do que 1 indica uma cooperatividade positiva da ligação do ligante. Essa é a situação observada na hemoglobina, na qual a ligação de uma molécula do ligante facilita a ligação de outras. O limite superior teórico para n_H é alcançado quando $n_H = n$. Nesse caso, a ligação seria totalmente cooperativa: todos os sítios da proteína ligariam o ligante simultaneamente, e não haveria nenhuma molécula da proteína parcialmente saturada sob qualquer tipo de condição. Na prática, esse limite nunca é atingido, e o valor medido de n_H sempre é menor do que o número real de sítios de ligação do ligante da proteína.

Um n_H menor do que 1 indica uma cooperatividade negativa, na qual a ligação de uma molécula do ligante interfere com a ligação de outras. São raros os casos bem documentados de cooperatividade negativa.

A fim de adaptar a equação de Hill à ligação do oxigênio com a hemoglobina, precisamos substituir pO_2 por [L] e P_{50} por K_d:

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log pO_2 - \log P_{50} \qquad (7\text{-}17)$$

Os "plots" de Hill para a mioglobina e a hemoglobina são apresentados na Figura 7-13.

Dois modelos sugerem mecanismos de ligação cooperativa

Hoje em dia, os bioquímicos sabem muito sobre os estados T e R da hemoglobina, mas muito ainda precisa ser estudado sobre como ocorre a transição T ⟶ R. Dois modelos influenciaram muito a concepção desse problema.

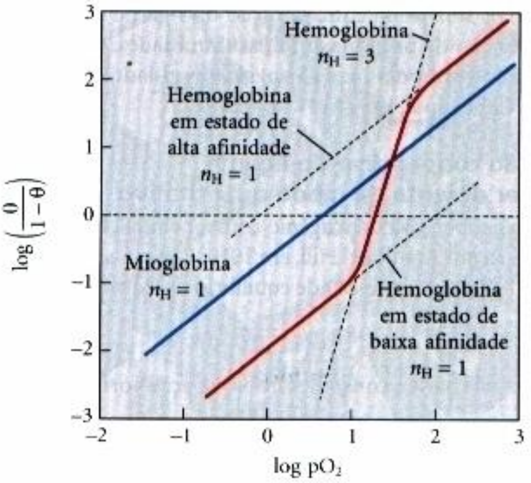


Figura 7-13 – "Plots" de Hill para a ligação de oxigênio à mioglobina e à hemoglobina. Quando $n_H = 1$, não há cooperatividade evidente. O grau máximo de cooperatividade observado para a hemoglobina corresponde aproximadamente a $n_H = 3$. Notar que, enquanto isso indica um alto nível de cooperatividade, n_H é menor do que n, o número de sítios de ligação de O_2 da hemoglobina. Isso é normal para uma proteína que apresenta um comportamento de ligação alostérica.

O primeiro modelo foi proposto por Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux, em 1965, e chamado de **modelo MWC**, ou **modelo da assimetria ajustada** (Fig. 7-14a). O modelo da assimetria ajustada assume que as subunidades de uma proteína com ligação cooperativa são funcionalmente idênticas, que cada subunidade pode existir em (pelo menos) duas conformações e que todas as subunidades passam, simultaneamente, pela transição de uma conformação para outra. Nesse modelo, nenhuma proteína tem subunidades individuais em conformações diferentes. As duas conformações estão em equilíbrio. O ligante pode ligar-se a qualquer conformação, mas liga-se a cada uma com afinidade diferente. A ligação sucessiva de moléculas do ligante à conformação de baixa afinidade (que é mais estável na ausência do ligante) torna mais provável a transição para a conformação de alta afinidade.

No segundo modelo, o **modelo seqüencial** (Fig. 7-14b), proposto em 1966 por Daniel Koshland e colaboradores, a ligação do ligante pode induzir uma mudança de conformação em uma subunidade individual. Uma mudança de conformação em uma subunidade aumenta a probabilidade de uma mudança semelhante em uma subunidade adjacente, assim como facilita a ligação de uma segunda molécula de ligante. Nesse modelo, há um maior número de estados intermediários potenciais do que no modelo da assimetria ajustada. Os dois modelos não são mutuamente excludentes; o modelo da assimetria ajustada pode ser visto como o caso limite "tudo-ou-nada" do modelo seqüencial. No Capítulo 8 usaremos esses modelos ao estudarmos as enzimas alostéricas.

A hemoglobina também transporta H^+ e CO_2

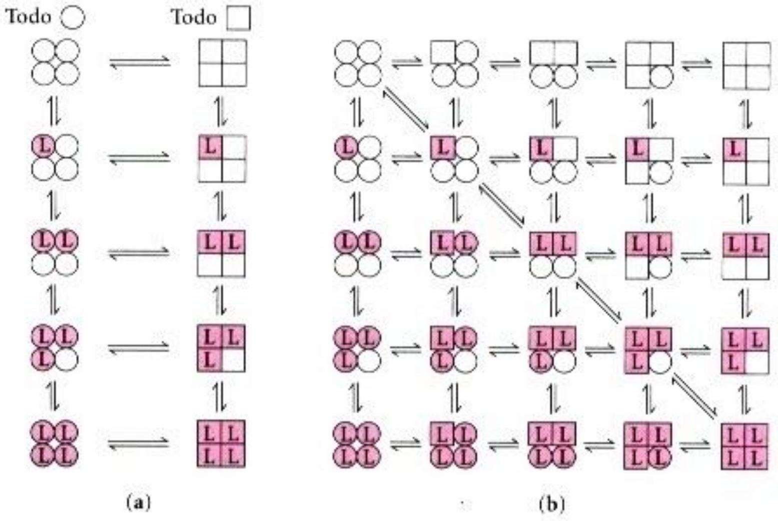
Além de transportar dos pulmões para os tecidos quase todo o oxigênio necessário para as células, a hemoglobina transporta dois produtos finais da respiração celular — H^+ e CO_2 — dos tecidos para os pulmões e rins, onde eles são excretados. O CO_2, produzido pela oxidação de combustíveis orgânicos nas mitocôndrias, é hidratado formando bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Esta reação é catalisada pela **anidrase carbônica**, uma enzima particularmente abundante nos eritrócitos. O dióxido de carbono não é muito solúvel em solução aquosa, e haveria a formação de borbulhas de CO_2 nos tecidos e no sangue se ele não fosse convertido em bicarbonato. Como mostra a equação, a hidratação de CO_2 resulta em um aumento da concentração de H^+ (uma diminuição do pH) dos tecidos. A ligação de oxigênio pela hemoglobina é influenciada profundamente pelo pH e pela concentração de CO_2, de modo que a interconversão entre CO_2 e bicarbonato é de grande importância para a regulação da ligação do oxigênio e sua liberação no sangue.

A hemoglobina transporta para os pulmões e rins cerca de 20% do total de H^+ e CO_2 formados nos tecidos. A ligação de H^+ e CO_2 é inversamente proporcional à ligação do oxigênio. Em pH relativamente baixo e alta concentração de CO_2 dos tecidos periféricos, a ligação de H^+ e CO_2 leva à diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e à liberação de O_2 nos tecidos. De maneira inversa, nos capilares do pulmão, com a excreção de CO_2 e a conseqüente elevação do pH, aumenta a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e a proteína liga mais O_2 para poder transportá-lo para os tecidos. Esse efeito do pH e da concentração de CO_2 sobre a ligação e a liberação do oxigênio pela hemoglobina é denominado **efeito de Bohr**, em homenagem a Christian Bohr, o fisiologista dinamarquês (e pai do físico Niels Bohr) que o descobriu em 1904.

Figura 7-14 – Dois modelos gerais da interconversão das formas inativa e ativa das proteínas com ligação-ligante cooperativa. Apesar de os modelos poderem ser aplicados a qualquer proteína — incluindo qualquer enzima (Capítulo 8) — que apresente ligação cooperativa, aqui estão representadas quatro subunidades porque o modelo original foi proposto para a hemoglobina. No modelo da assimetria ajustada, ou "tudo-ou-nada" (**a**), é postulado que todas as subunidades estão na mesma conformação, sejam todos ○ (baixa afinidade ou inativo) ou todos □ (alta afinidade ou ativo). Dependendo do equilíbrio, K_1, entre as formas ○ e □, a ligação de uma ou mais moléculas de ligante (L) tenderá ao equilíbrio para a forma □. As subunidades com L ligados estão sombreadas em vermelho. No modelo seqüencial (**b**), cada subunidade individual pode estar na forma ○ ou □. Portanto, é possível um número muito grande de conformações.



O equilíbrio da ligação da hemoglobina com uma molécula de oxigênio pode ser descrito pela reação

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

mas isso não é uma afirmativa correta. Levando-se em conta o efeito da concentração de H^+ sobre esse equilíbrio de ligação, devemos reescrever a reação da seguinte maneira

$$HHb^+ + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+$$

onde HHb^+ representa uma forma protonada da hemoglobina. Esta equação nos diz que a curva de saturação de O_2 da hemoglobina é influenciada pela concentração de H^+ (Fig. 7-15). Tanto o O_2 como o H^+ ligam-se à hemoglobina, mas com afinidade inversa. Quando a concentração de oxigênio é alta, como nos pulmões, a hemoglobina liga O_2 e libera prótons. Quando a concentração de oxigênio é baixa, como nos tecidos periféricos, o H^+ é ligado e o O_2 liberado.

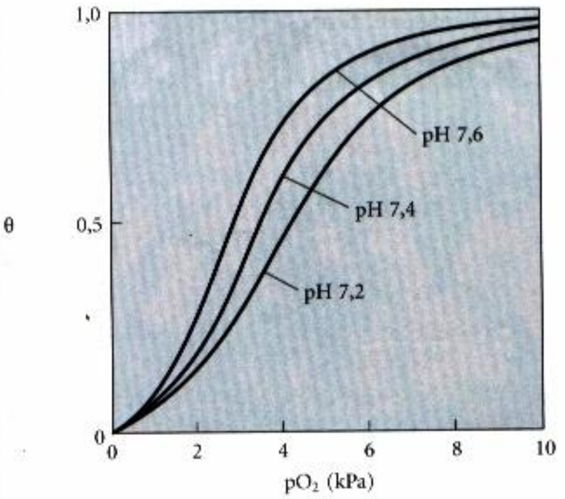
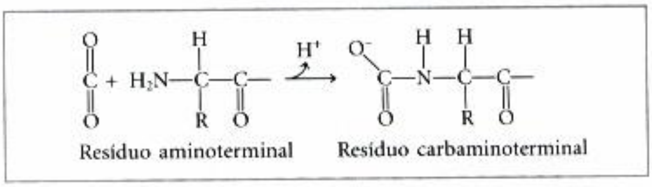


Figura 7-15 – Efeito do pH sobre a ligação do oxigênio com a hemoglobina. O pH do sangue é 7,6 nos pulmões e 7,2 nos tecidos. As medidas experimentais da ligação da hemoglobina são feitas, em geral, em pH 7,4.

O oxigênio e o H^+ não se ligam ao mesmo sítio da hemoglobina. O oxigênio liga-se aos átomos de ferro do heme, enquanto o H^+ se liga a qualquer um dos resíduos de aminácidos da proteína. Uma importante contribuição para o efeito Bohr é dada por His^{146} (His HC3) das subunidades β. Quando protonado, esse resíduo forma um dos pares de íons — ao Asp^{94} (Asp (FG1) — que ajuda a estabilizar a desoxiemoglobina no estado T (Fig. 7-9). O par iônico estabiliza a forma protonada de His HC3, dando a esse resíduo um pK_a anormalmente alto no estado T. No estado R, o pK_a cai para 6,0, seu valor normal, pois o par iônico não pode formar-se, e, na oxiemoglobina em pH 7,6, o pH do sangue dos pulmões, esse resíduo fica em grande parte não protonado. Com a elevação da concentração de H^+, a protonação de His HC3 facilita a liberação de oxigênio, pois favorece uma transição para o estado T. A protonação dos resíduos aminoterminais das subunidades α, de outros resíduos His e, talvez, de outros grupos tem efeito semelhante.

Assim, observamos que as quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina se comunicam umas com as outras, não somente quanto à ligação de O_2 a seus grupos heme, mas também quanto à ligação de H^+ a resíduos de aminoácidos específicos. Mas os fatos são mais complicados. A hemoglobina liga também CO_2 e de maneira inversamente proporcional à ligação do oxigênio. O dióxido de carbono liga-se como um grupo carbamato ao grupo α-amino na extremidade aminoterminal de cada cadeia de globina, formando carbaminoemoglobina:

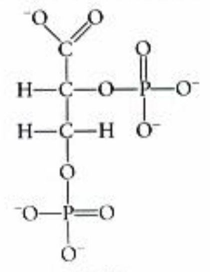


Esta reação produz H^+, contribuindo para o efeito de Bohr. Os carbamatos ligados também formam pontes salinas adicionais (não mostradas na Fig. 7-9), que ajudam a estabilizar o estado T, e promovem a liberação de oxigênio.

Quando a concentração de dióxido de carbono é alta, como ocorre nos tecidos periféricos, um pouco de CO_2 liga-se à hemoglobina, diminuindo a afinidade por O_2 e causando sua liberação. De maneira inversa, quando a hemoglobina chega aos pulmões, a alta concentração de oxigênio promove a ligação de O_2 e a liberação de CO_2. É a capacidade de comunicar a informação ligante-ligação de uma subunidade de polipeptídeo a outras que torna a molécula de hemoglobina tão adequadamente adaptada para a integração do transporte de O_2, CO_2 e H^+ pelos eritrócitos.

A ligação do oxigênio à hemoglobina é regulada por 2,3-bifosfoglicerato

A interação de **2,3-bifosfoglicerato** (BPG) com a hemoglobina constitui um exemplo de modulação alostérica heterotópica.



2,3-Bifosfoglicerato

O BPG está presente nos eritrócitos, em concentrações relativamente altas. Quando se isola a hemoglobina, ela retém quantidades consideráveis de BPG, o qual pode ser difícil de ser totalmente removido. De fato, as curvas de ligação de O_2 da hemoglobina que vimos até agora foram obtidas em presença de BPG ligado. Sabe-se que o 2,3-bifosfoglicerato reduz de maneira significativa a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio — há uma relação inversa entre a ligação de O_2 e a ligação de BPG. Podemos, por isso, descrever outro processo de ligação para a hemoglobina:

$$HbBPG + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + BPG$$

O BPG liga-se a um sítio distante do sítio de ligação com o oxigênio e regula a afinidade de ligação da hemoglobina para o oxigênio em relação ao pO_2 dos pulmões. O BPG desempenha um papel importante na adaptação fisiológica ao pO_2 mais baixo disponível em grandes altitudes. Em um ser humano sadio passeando à beira-mar, a ligação de O_2 à hemoglobina é regulada de tal maneira que a quantidade de O_2 entregue nos tecidos é equivalente a quase 40% do máximo que poderia ser transportado pelo sangue (Fig. 7-16). Se a mesma pessoa for transportada rapidamente para uma montanha, a uma altitude de 4.500

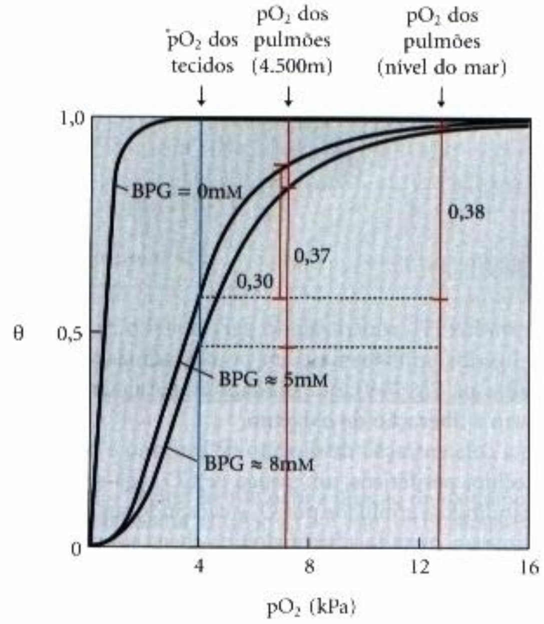


Figura 7-16 – Efeito do BPG sobre a ligação do oxigênio à hemoglobina. A concentração de BPG no sangue humano normal é cerca de 5mM ao nível do mar e cerca de 8mM em altitudes elevadas. Note que a hemoglobina se liga ao oxigênio bastante firmemente quando o BPG está totalmente ausente, e a curva de ligação parece ser hiperbólica. Na realidade, o coeficiente de Hill medido para a cooperatividade da ligação de O$_2$ somente diminui levemente (de 3 para cerca de 2,5) quando o BPG é removido da hemoglobina, mas a parte ascendente da curva sigmóide fica confinada a uma região muito pequena perto da origem. Ao nível do mar, nos pulmões, a hemoglobina está quase totalmente saturada com O$_2$, mas somente está saturada em 60% nos tecidos, de modo que a quantidade de oxigênio liberada nos tecidos está próxima de 40% do máximo que pode ser transportado no sangue. Em grandes altitudes, a entrega de O$_2$ diminui em cerca de um quarto, 30% do máximo. Entretanto, um aumento da concentração de BPG diminui a afinidade da hemoglobina por O$_2$, de modo que, novamente, quase 40% do que pode ser transportado é entregue nos tecidos.

metros, onde o pO$_2$ é consideravelmente mais baixo, haverá redução do O$_2$ liberado nos tecidos. Entretanto, após apenas algumas horas a altitudes elevadas, a concentração de BPG do sangue começa a elevar-se, causando uma diminuição da afinidade da hemoglobina com o oxigênio. Esse ajuste do nível de BPG tem apenas um ligeiro efeito sobre a ligação de O$_2$ nos pulmões, mas exerce um efeito considerável sobre a liberação de O$_2$ nos tecidos. Disso resulta que a liberação de oxigênio aos tecidos retorna a quase 40% do que pode ser transportado pelo sangue. A situação é invertida quando a pessoa volta para o nível do mar. A concentração de BPG dos eritrócitos também aumenta em pessoas com **hipóxia**, uma oxigenação reduzida dos tecidos periféricos por causa de uma deficiência no funcionamento dos pulmões ou do sistema circulatório.

O BPG liga-se à hemoglobina na cavidade existente entre as subunidades β do estado T (Fig. 7-17). Essa cavidade é revestida por resíduos de aminoácidos com carga positiva, que interagem com os grupos de carga negativa do BPG. Diferentemente do O$_2$, somente uma molécula de BPG liga-se a cada tetrâmero da hemoglobina. O BPG abaixa a afinidade da hemoglobina por oxigênio, pois estabiliza o estado T. A transição para o estado R torna mais estreita a fenda de ligação do BPG, impedindo a ligação deste. Na ausência de BPG, a hemoglobina é convertida para o estado R com maior facilidade.

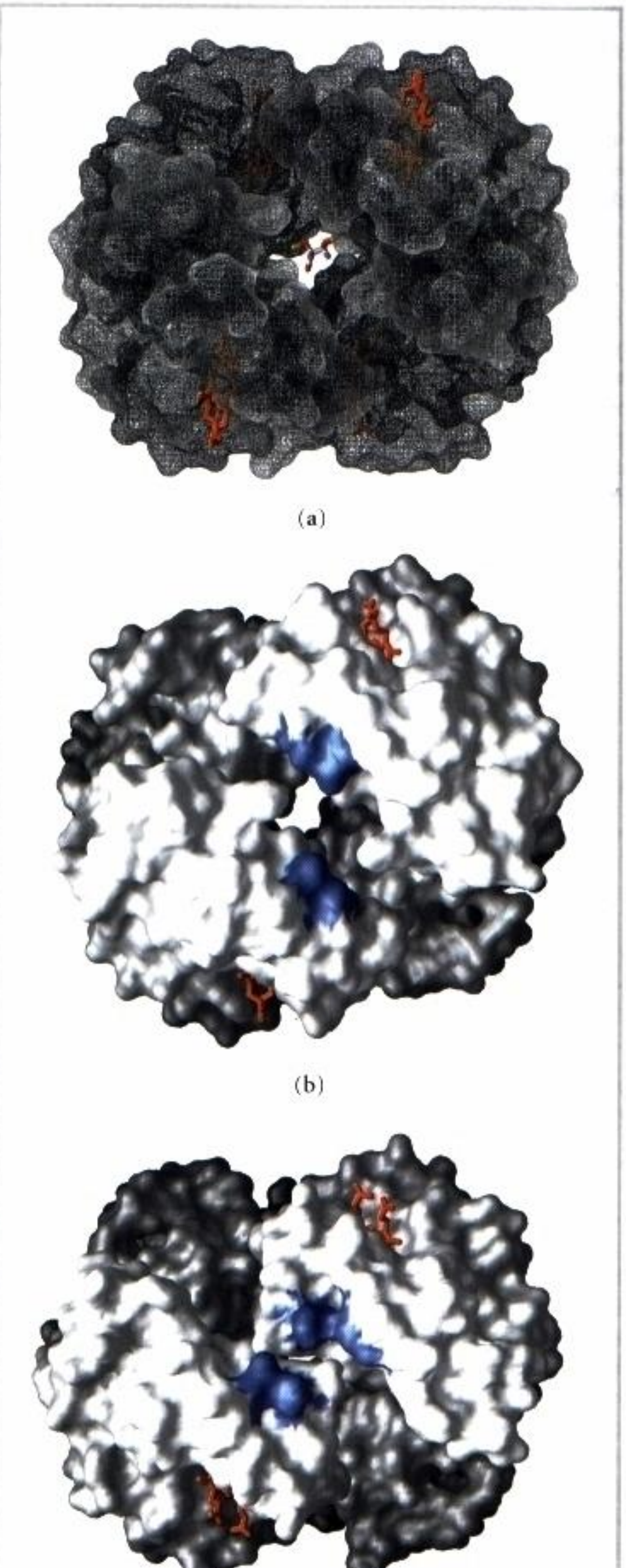


Figura 7-17 – Ligação do BPG à desoxiemoglobina. (**a**) A ligação do BPG estabiliza o estado T da desoxiemoglobina, mostrada aqui como a imagem de uma superfície entrelaçada. (**b**) As cargas negativas do BPG interagem com vários grupos com carga negativa (mostrados em azul nesta imagem GRASP da imagem da superfície) que envolvem o bolso entre as subunidades β no estado T. (**c**) A fenda de ligação para o BPG desaparece com a oxigenação, após a transição para o estado R. (Compare (**b**) e (**c**) com a Fig. 7-10.)

A regulação da ligação do oxigênio à hemoglobina pelo BPG tem um papel importante no desenvolvimento fetal. Como o feto precisa extrair oxigênio do sangue da mãe, a hemoglobina fetal precisa ter maior afinidade com O_2 do que a hemoglobina materna. Nos fetos são sintetizadas subunidades γ em vez de subunidades β, formando hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$. Esse tetrâmero tem uma afinidade muito menor com BPG do que a hemoglobina normal do adulto, e, assim, uma afinidade maior com O_2.

A anemia falciforme é uma doença molecular da hemoglobina

A grande importância da seqüência de aminoácidos para a determinação das estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas globulares e, dessa maneira, de suas funções biológicas é demonstrada de maneira muito clara pela anemia falciforme, uma doença humana hereditária. É sabido que, na população humana, ocorrem mais de 300 variantes genéticas da hemoglobina. A maioria dessas variações consiste em diferenças em apenas um resíduo de aminoácido. Os efeitos sobre a estrutura e a função da hemoglobina são, com freqüência, pequenos, mas algumas vezes podem ser marcantes. Cada variante da hemoglobina é o produto da alteração de um gene. Os genes variantes são denominados alelos. Como, geralmente, os seres humanos têm duas cópias de cada gene, um indivíduo pode ter duas cópias de um alelo (sendo, portanto, homozigoto para aquele gene), ou uma cópia de cada um de dois alelos diferentes (heterozigotos). A anemia falciforme é uma doença genética na qual um indivíduo herda um alelo para a hemoglobina falciforme de ambos os pais. Os eritrócitos desses indivíduos são em menor número e anormais. Além de um aumento desproporcional do número de células imaturas, o sangue contém muitos eritrócitos longos, delgados, em forma de meia-lua, que se assemelham à lâmina de uma foice (Fig. 7-18). Quando a hemoglobina das células falciformes (denominada hemoglobina S) é desoxigenada, ela se torna insolúvel e forma polímeros que se agregam em fibras tubulosas (Fig. 7-19). A hemoglobina normal (hemoglobina A) permanece solúvel na desoxigenação. As fibras insolúveis da hemoglobina S, desoxigenada, são responsáveis pela deformação falciforme dos eritrócitos, e a proporção de células falciformes aumenta muito com a desoxigenação do sangue.

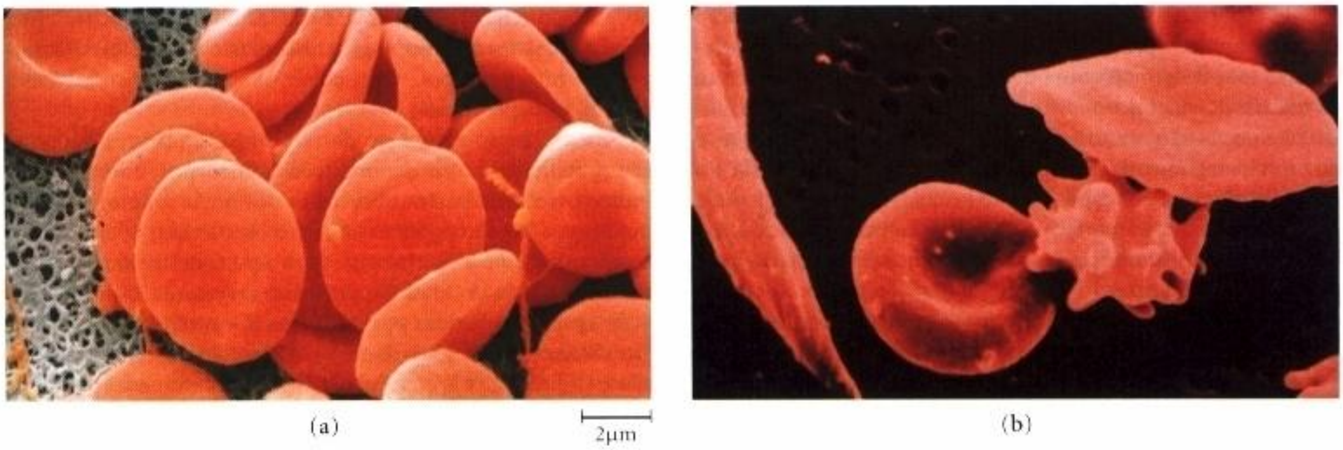


Figura 7-18 – Comparação de eritrócitos normais, uniformes, côncavos (**a**), com eritrócitos de forma variada vistos na anemia falciforme (**b**). Estas células variam de normais a espinhosas ou falciformes.

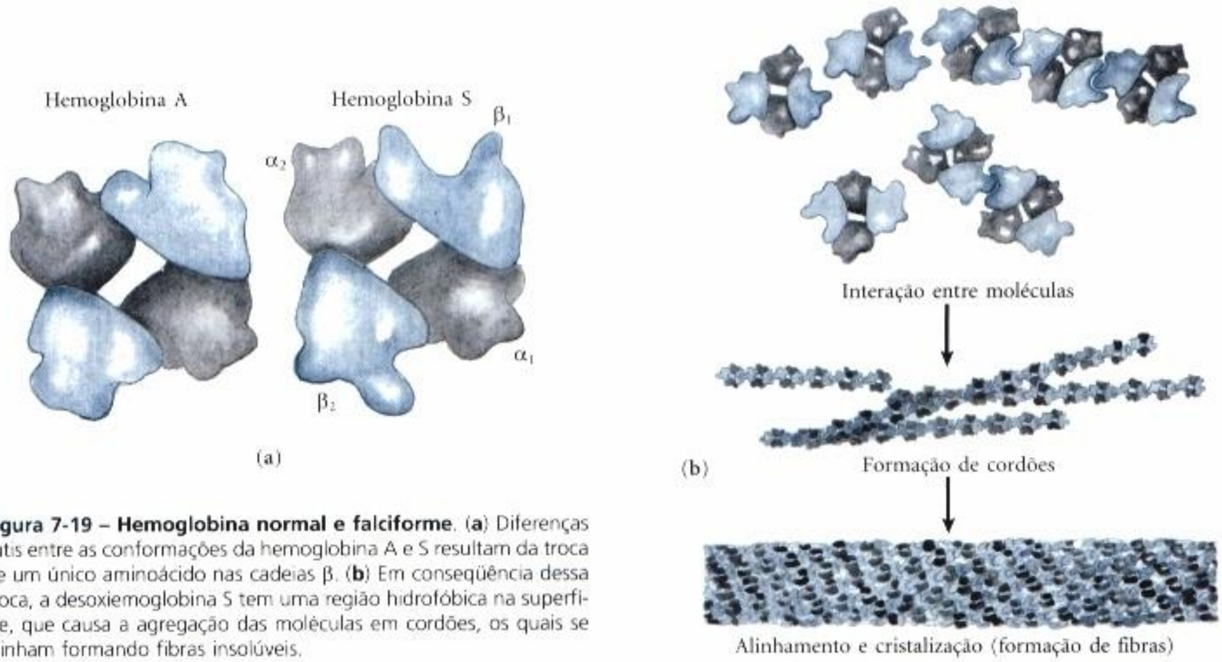

Hemoglobina A
Hemoglobina S
β₁
α₂
α₁
β₂
(a)
Interação entre moléculas
Formação de cordões
(b)
Alinhamento e cristalização (formação de fibras)

Figura 7-19 – Hemoglobina normal e falciforme. (**a**) Diferenças sutis entre as conformações da hemoglobina A e S resultam da troca de um único aminoácido nas cadeias β. (**b**) Em conseqüência dessa troca, a desoxiemoglobina S tem uma região hidrofóbica na superfície, que causa a agregação das moléculas em cordões, os quais se alinham formando fibras insolúveis.

Essas propriedades alteradas da hemoglobina S resultam da substituição de um único aminoácido, um resíduo Val em vez de um resíduo Glu na posição 6 das duas cadeias β. O grupo R da valina não tem carga elétrica, enquanto, em pH 7,4, o glutamato tem uma carga negativa. Por isso, a hemoglobina S tem duas cargas negativas a menos do que a hemoglobina A, uma para cada uma das duas cadeias β. A substituição do resíduo Glu por Val cria um ponto de contato hidrofóbico grudento na posição 6 da cadeia β, que fica na superfície externa da molécula. Essas regiões grudentas fazem com que as moléculas de desoxiemoglobina se associem de maneira anormal umas com as outras formando longos agregados fibrosos característicos dessa doença.

A anemia falciforme ocorre em indivíduos homozigotos para o alelo falciforme do gene que codifica a subunidade β da hemoglobina. Os indivíduos que recebem o alelo falciforme de somente um dos pais e são, portanto, heterozigotos, possuem uma condição mais discreta denominada de traço falciforme; somente cerca de 1% de seus eritrócitos tornam-se falciformes na desoxigenação. Esses indivíduos podem levar uma vida completamente normal desde que evitem exercícios intensos ou outros tipos de estresse para o sistema circulatório.

As pessoas com anemia falciforme sofrem crises freqüentes causadas por exercício físico. Tornam-se fracas, com respiração curta, e também apresentam murmúrio cardíaco e pulso acelerado. O teor de hemoglobina de seu sangue é de somente cerca da metade do valor normal, de 15 a 16g/100mL, porque as células falciformes são muito frágeis e se rompem com facilidade, o que resulta em anemia. Uma conseqüência ainda mais séria é o bloqueio anormal dos capilares pelas células longas, o que pode causar dor intensa e interferir com a função normal dos órgãos — um fator importante para a morte precoce de muitas das pessoas com essa doença.

Sem tratamento médico, as pessoas com anemia falciforme geralmente morrem na infância. Não obstante, o alelo falciforme é bastante comum em certas partes da África. A pesquisa sobre a persistência de um alelo que é tão obviamente deletério a indivíduos homozigotos levou à descoberta de que esse alelo confere uma pequena mas significativa resistência às formas letais da malária nos indivíduos heterozigotos. A seleção natural deu origem a uma população de alelos que equilibra os efeitos deletérios da condição homozigota com a resistência contra a malária favorecida pela condição heterozigota.

Interações Complementares entre Proteínas e Ligantes: Sistema Imunológico e Imunoglobulinas

Nossa discussão sobre as proteínas ligantes de oxigênio demonstrou como a conformação dessas proteínas pode afetar e ser afetada pela ligação de pequenos ligantes (O_2 ou CO) ao grupo heme. Entretanto, a maioria das interações proteína-ligante não envolve um grupo prostético. Em vez disso, o sítio de ligação de um ligante assemelha-se, mais freqüentemente, ao sítio de ligação do BPG da hemoglobina — uma fenda na proteína revestida por resíduos de aminoácidos dispostos de maneira a tornar altamente específica a interação de ligação. Nos sítios de ligação, a norma é uma discriminação eficiente entre os ligantes, mesmo quando estes apresentam apenas diferenças estruturais mínimas.

Todos os vertebrados têm um sistema imunológico capaz de distinguir o "próprio" do "não-próprio" e, então, destruir as entidades identificadas como não-próprias. Dessa maneira, o sistema imunológico elimina vírus, bactérias e outros patógenos, assim como quaisquer moléculas que possam vir a constituir uma ameaça ao organismo. Em nível fisiológico, a resposta do sistema imunológico contra um invasor é constituída por um conjunto de interações, complexas e coordenadas, entre diversas classes de proteínas, moléculas e tipos celulares. Entretanto, em termos das proteínas individuais, a resposta imune demonstra como um sistema bioquímico, extremamente sensível e específico, é construído com base na interação de ligantes a proteínas.

A resposta imunológica caracteriza-se por um grande número de células e proteínas especializadas

A imunidade é função de uma variedade de **leucócitos** (glóbulos brancos), incluindo **macrófagos** e **linfócitos**, os quais se originam de células-tronco indiferenciadas, originárias da medula óssea. Os leucócitos podem sair da corrente sangüínea e patrulhar os tecidos, cada célula produzindo uma ou mais proteínas capazes de reconhecer e ligar-se a moléculas que sinalizam uma infecção.

A resposta imunológica consiste de dois sistemas complementares, o sistema imunológico humoral e o celular. O **ramo humoral do sistema imunológico** (do latim *humor*, "fluido") é dirigido contra infecções bacterianas e vírus extracelulares (os encontrados nos fluidos do corpo), mas também pode ser ativado por proteínas particulares injetadas no organismo. O **ramo celular do sistema imunológico** destrói não só as células do hospedeiro infectadas por vírus, como também alguns parasitas e tecidos transplantados.

As proteínas no âmago da resposta imunológica humoral são proteínas solúveis denominadas **anticorpos**, ou **imunoglobulinas**, freqüentemente abreviadas por Ig. As imunoglobulinas ligam-se a bactérias, vírus ou macromoléculas identificados como estranhos e os marcam para serem destruídos. Constituindo até 30% do total das proteínas do plasma, as imunoglobulinas são produzidas por **linfócitos B**, ou **células B**.

Os agentes no âmago da resposta imunológica celular são uma classe de **linfócitos T**, ou **células T** (assim denominadas porque os últimos estágios de seu desenvolvimento ocorrem no *t*imo) conhecidas por **células T citotóxicas** (**células T_C**, também denominadas células T assassinas, "killer cells"). No reconhecimento de células infectadas ou de parasitas participam proteínas denominadas **receptores da célula T** situados na superfície das células T_C. No Capítulo 2 (pág. 22) foi explicado que os receptores são proteínas geralmente encontradas na superfície externa das células e atravessam a membrana plasmática; eles reconhecem e ligam ligantes extracelulares, desencadeando mudanças dentro da célula.

Além das células T citotóxicas, as **células T auxiliadoras** (**helper, T_H**) têm a função de sintetizar proteínas sinalizadoras solúveis denominadas citocinas, entre as quais estão as interleucinas. As células T_H interagem com macrófagos. A Tabela 7-2 resume as funções dos vários leucócitos do sistema imunológico.

Tabela 7-2 – Alguns tipos de leucócitos associados ao sistema imunológico

Tipo celular	Função
Macrófagos	Ingerem partículas e células por fagocitose
Linfócitos B (células B)	Produzem e secretam anticorpos
Linfócitos T (células T)	
Células citotóxicas (assassinas) (T_C)	Interagem com células infectadas do hospedeiro pelos receptores da superfície de células T
Células T "helper" (T_H)	Interagem com macrófagos e secretam citocinas (interleucinas) que estimulam a proliferação de células T_C, T_H e B

Cada proteína de reconhecimento do sistema imunológico, seja ela o anticorpo produzido por uma célula B, seja ela um receptor da superfície de uma célula T, combina-se especificamente com uma estrutura química particular, distinguindo-a de virtualmente todas as outras existentes. Os seres humanos são capazes de produzir mais de 10^8 anticorpos diferentes, com especificidades de ligação distintas. Essa extraordinária diversidade torna provável que qualquer estrutura química da superfície de um vírus ou célula invasora seja reconhecida e ligada por um ou mais anticorpos. A diversidade dos anticorpos são o resultado de rearranjo ao acaso de um conjunto de segmentos gênicos de imunoglobulinas por mecanismos de recombinação genética que serão discutidos no Capítulo 25.

Algumas propriedades das interações entre os anticorpos, ou receptores de células T, e as moléculas a que eles se ligam são particulares do sistema imunológico, e uma nomenclatura especializada é utilizada para descrevê-las. Toda molécula ou patógeno capaz de induzir uma resposta imunológica é denominado de **antígeno**. Um antígeno pode ser um vírus, uma parede celular bacteriana ou uma proteína ou outra macromolécula particular. Um antígeno complexo pode interagir com vários anticorpos diferentes. Um anticorpo, ou receptor de célula T, particular liga uma única estrutura molecular característica na superfície do antígeno, denominada **determinante antigênico** ou **epitopo**.

Não seria produtivo para o sistema imunológico responder a pequenas moléculas que são intermediários comuns e produtos do metabolismo celular. As moléculas com $M_r < 5.000$ geralmente não são antigênicas. Entretanto, em laboratório, pequenas mòléculas podem ser covalentemente acopladas a proteínas de elevado peso molecular, e sob essa forma elas podem induzir uma resposta imunológica. Essas moléculas pequenas são denominadas **haptenos**. Os anticorpos produzidos em resposta a haptenos conjugados a proteínas ligar-se-ão às mesmas pequenas moléculas mesmo quando elas estiverem livres. Algumas vezes esses anticorpos são usados para criar testes analíticos, descritos mais adiante neste capítulo.

As interações do anticorpo com o antígeno são muito mais bem compreendidas do que as propriedades de ligação dos receptores das células T. Entretanto, antes de dirigir nossa atenção para os anticorpos, precisamos investigar mais detalhadamente os sistemas imunológicos humoral e celular de modo a colocar as interações bioquímicas fundamentais num contexto adequado.

A apresentação de peptídeos na superfície das células distingue o "próprio" do "não-próprio"

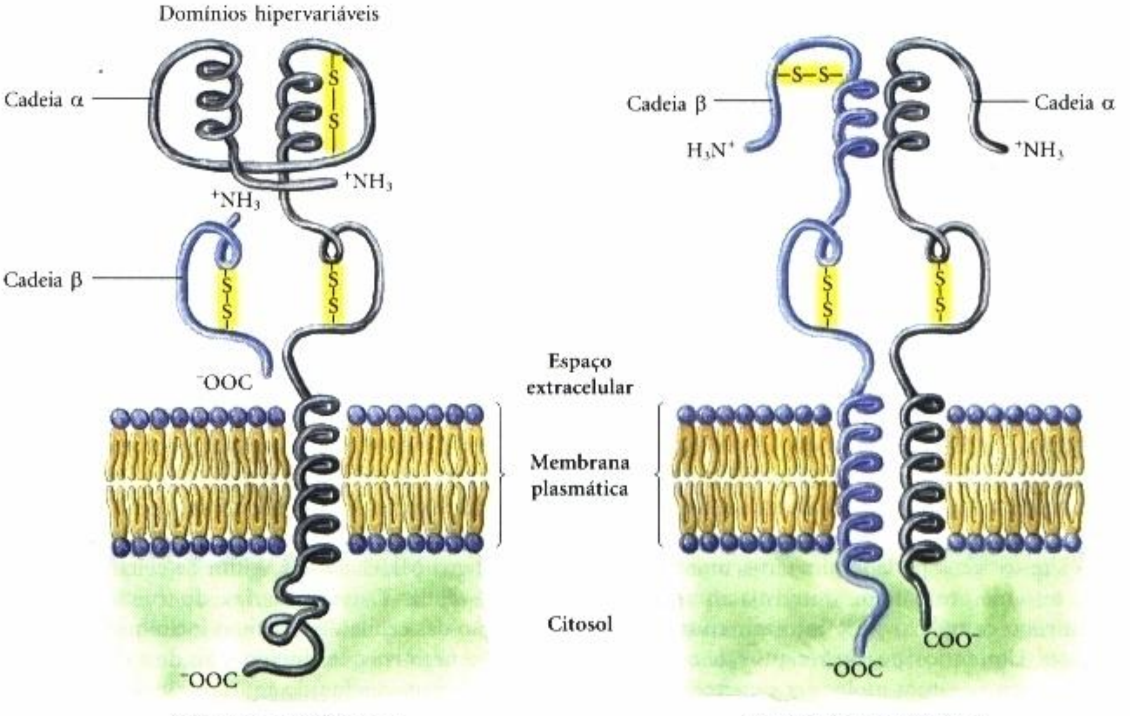
O sistema imune precisa identificar e destruir patógenos, mas também reconhecer e *não* destruir as proteínas e as células normais do organismo hospedeiro — o "próprio". O reconhecimento de antígenos protéicos do hospedeiro é mediado pelas **proteínas MHC** (do inglês "major histocompatibility complex", complexo principal de histocompatibilidade). As proteínas MHC ligam fragmentos de peptídeos de proteínas digeridas pelas **células apresentadoras de antígeno** e os apresentam na superfície externa dessa célula. Normalmente, esses peptídeos são derivados da digestão de proteínas celulares, mas, durante uma infecção por vírus, proteínas virais também são digeridas e apresentadas em associação com proteínas do MHC. Os fragmentos de peptídeos de proteínas estranhas apresentadas com proteínas MHC constituem os antígenos que o sistema imunológico reconhece como "não-próprio". Receptores de células T ligam esses fragmentos e desencadeiam as etapas subseqüentes da resposta imunológica. Há duas classes de proteínas MHC (Fig. 7-20), que diferem tanto na sua distribuição entre os tipos celulares como na fonte das proteínas digeridas cujos peptídeos elas apresentam.

As proteínas **MHC classe I** (Fig. 7-21) são encontradas na superfície de virtualmente todas as células dos vertebrados. Há inúmeras variantes na população humana, o que as coloca entre as proteínas mais polimórficas. Como cada indivíduo produz até seis variantes da proteína MHC classe I, é improvável que dois indivíduos quaisquer tenham o mesmo conjunto. As proteínas MHC classe I ligam e apresentam peptídeos provenientes da degradação e "turnover" de proteínas, que ocorrem ao acaso dentro da célula. Esses complexos de peptídeos e proteínas MHC classe I são os alvos de reconhecimento dos receptores da célula T das células T_C do sistema imunológico celular. O padrão geral do reconhecimento pelo sistema imunológico foi descrito primeiramente por Rolf Zinkernagel e Peter Doherty, em 1974.

Cada célula T_C tem muitas cópias de um único receptor da célula T que é específico para um determinado complexo peptídeo–proteína MHC classe I. A fim de evitar a geração de uma legião de células T_C que atacaria e destruiria células normais, a maturação das células T_C no timo inclui um rigoroso processo de seleção negativa que elimina mais de 85% das células T_C em desenvolvimento, incluindo aquelas que poderiam reconhecer e ligar-se a proteínas MHC classe I que estivessem apresentando peptídeos de proteínas celulares do próprio organismo. As células T_C que sobrevivem e amadurecem são aquelas com receptores de célula T que não se ligam às proteínas do próprio organismo. Disso resulta uma população de células que ligam peptídeos estranhos associados a proteínas MHC classe I da célula hospedeira. Essas interações de ligações levam à destruição de parasitas e células infectadas por vírus. Quando um órgão é transplantado, suas proteínas MHC classe I estranhas também são ligadas por células T_C, levando à rejeição do tecido.

As proteínas **MHC classe II** ocorrem na superfície de alguns tipos de células especializadas que captam antígenos estranhos, e que incluem macrófagos e linfócitos B. Do mesmo modo que as proteínas MHC classe I, as proteínas MHC classe II são altamente polimórficas, com muitas variantes na população humana. Cada ser humano é capaz de produzir até 12 variantes e, portanto, é improvável que quaisquer dois indivíduos tenham um conjunto idêntico de variantes. As proteínas MHC classe II ligam e apresentam peptídeos derivados não das proteínas celulares, mas de proteínas externas ingeridas pelas células. Os complexos proteínas MHC classe II–peptídeo resultantes são os alvos para a ligação de receptores de células T das várias células T "helper" (auxiliares). As células T_H, do mesmo modo que as células T_C, passam por um processo de seleção rigoroso no timo, sendo eliminadas aquelas que reconhecem as proteínas celulares do próprio indivíduo.

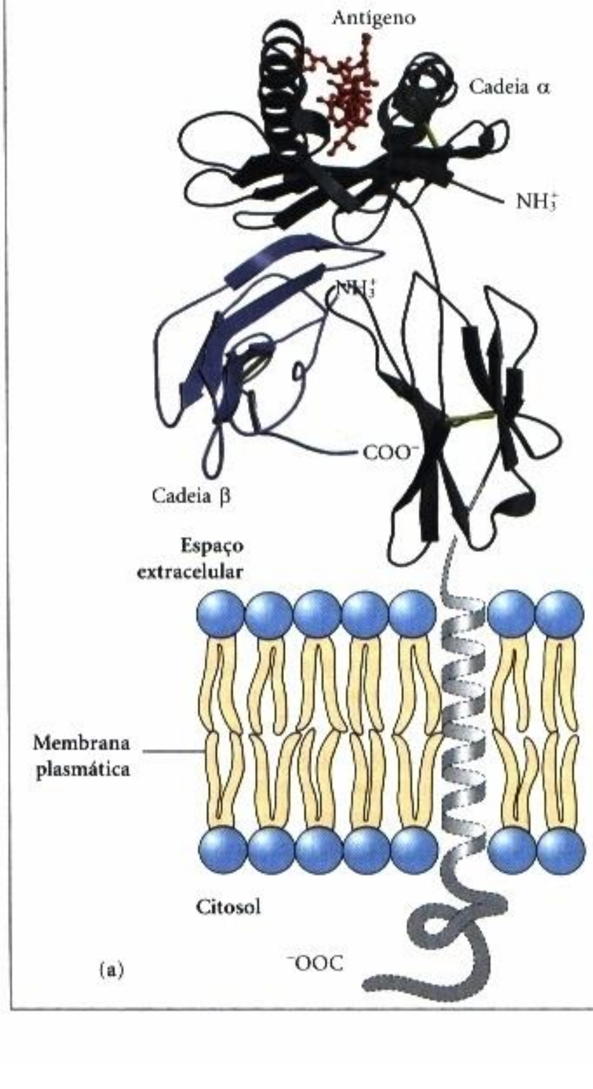
A despeito da eliminação da maioria das células T_C e T_H durante o processo de seleção no timo, um número muito grande sobrevive, e essas células participam da resposta imunológica. Cada célula sobrevivente tem um único tipo de receptor da célula T que pode ligar-se a somente uma determinada estrutura química. O conjunto das células T, as quais patrulham a corrente sangüínea e os tecidos, expressa milhões de diferentes especificidades de ligação nos seus receptores das células T. Na população de células T, altamente variada, quase sempre há um contingente de células que pode ligar especificamente qualquer antígeno que possa aparecer. A vasta maioria dessas células nunca encontra um antígeno estranho ao qual ela possa ligar-se e, tipicamente, morre em alguns dias, sendo substituída por novas gerações de células T que patrulham incessantemente em busca da interação que desencadeará a resposta imunológica completa.


Domínios hipervariáveis
Cadeia α
S–S
$^+NH_3$
$^+NH_3$
Cadeia β
S–S
S–S
^-OOC
Espaço extracelular
Membrana plasmática
Citosol
^-OOC
Cadeia β
–S–S–
Cadeia α
H_3N^+
$^+NH_3$
S–S
S–S
COO⁻
^-OOC

(a) Proteína MHC classe I

(b) Proteína MHC classe II

Figura 7-20 – Proteínas MHC. Estas proteínas consistem de cadeias α e β. Nas proteínas MHC de classe I (**a**), a pequena cadeia β é invariável, mas a seqüência da cadeia α mostra um alto grau de variabilidade localizada em domínios particulares da proteína, que estão expostos na superfície da célula. Cada ser humano produz até seis cadeias α diferentes para as proteínas MHC classe I. Nas proteínas MHC classe II (**b**), ambas as cadeias α e β têm regiões com variabilidade relativamente alta próximo a suas extremidades aminoterminais.


Antígeno
Cadeia α
NH_3^+
NH_3^+
COO⁻
Cadeia β
Espaço extracelular
Membrana plasmática
Citosol
(a)
^-OOC

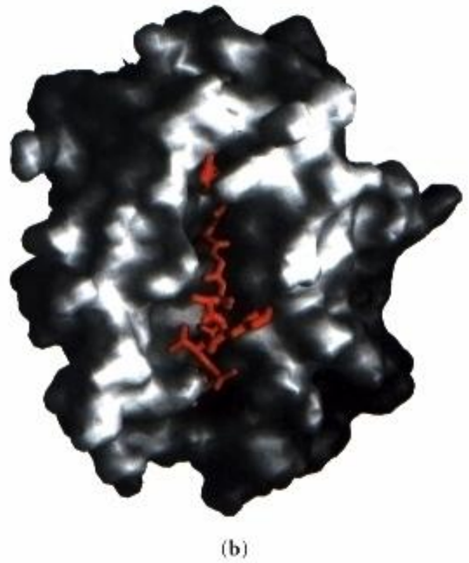


Figura 7-21 – Estrutura de uma proteína MHC de classe I humana. (**a**) Esta imagem obtida, em parte, da estrutura determinada para a porção extracelular dessa proteína. A cadeia α da MHC é mostrada em cinza; a pequena cadeia β, em azul; as ligações dissulfeto, em amarelo. Um ligante ligado, peptídeo derivado do HIV, é mostrado em vermelho. (**b**) Vista de cima mostrando uma imagem do contorno da superfície do sítio ao qual os peptídeos são ligados e apresentados. O peptídeo HIV (vermelho) ocupa o sítio. Essa parte da proteína MHC classe I interage com receptores da célula T.

Interações moleculares na superfície celular desencadeiam a resposta imunológica

Um antígeno novo é, com freqüência, um indicativo de uma infecção — um sinal para o sistema imunológico de que um vírus ou outro parasita pode estar crescendo rapidamente no organismo. As poucas células T e B, que expressam receptores, ou anticorpos, que ligam o antígeno, precisam propagar-se de maneira rápida e seletiva, a fim de eliminar a infecção. Uma infecção a vírus hipotética ilustra como isso ocorre.

Quando um vírus invade uma célula, ele faz uso de funções e recursos das células a fim de replicar seu ácido nucléico e criar proteínas virais. Um vez dentro da célula, as macromoléculas do vírus são relativamente inacessíveis aos anticorpos do sistema imunológico humoral. Entretanto, algumas das proteínas MHC classe I que chegam à superfície de uma célula infectada geralmente apresentam fragmentos de peptídeos de proteínas virais, os quais podem então ser reconhecidos por linfócito T_C. Vírus maduros tornam-se vulneráveis ao sistema imunológico humoral ao serem liberados da célula infectada e se apresentarem durante algum tempo no meio extracelular. Alguns são, então, ingeridos por macrófagos (que ingerem somente os antígenos reconhecidos por anticorpos produzidos por uma determinada célula B). Fragmentos de peptídeos virais são apresentados na superfície dos macrófagos e células B, formam complexos com proteínas MHC classe II, e os peptídeos antigênicos desencadeiam uma resposta múltipla que envolve células B, células T_C e células T_H (Fig. 7-22).

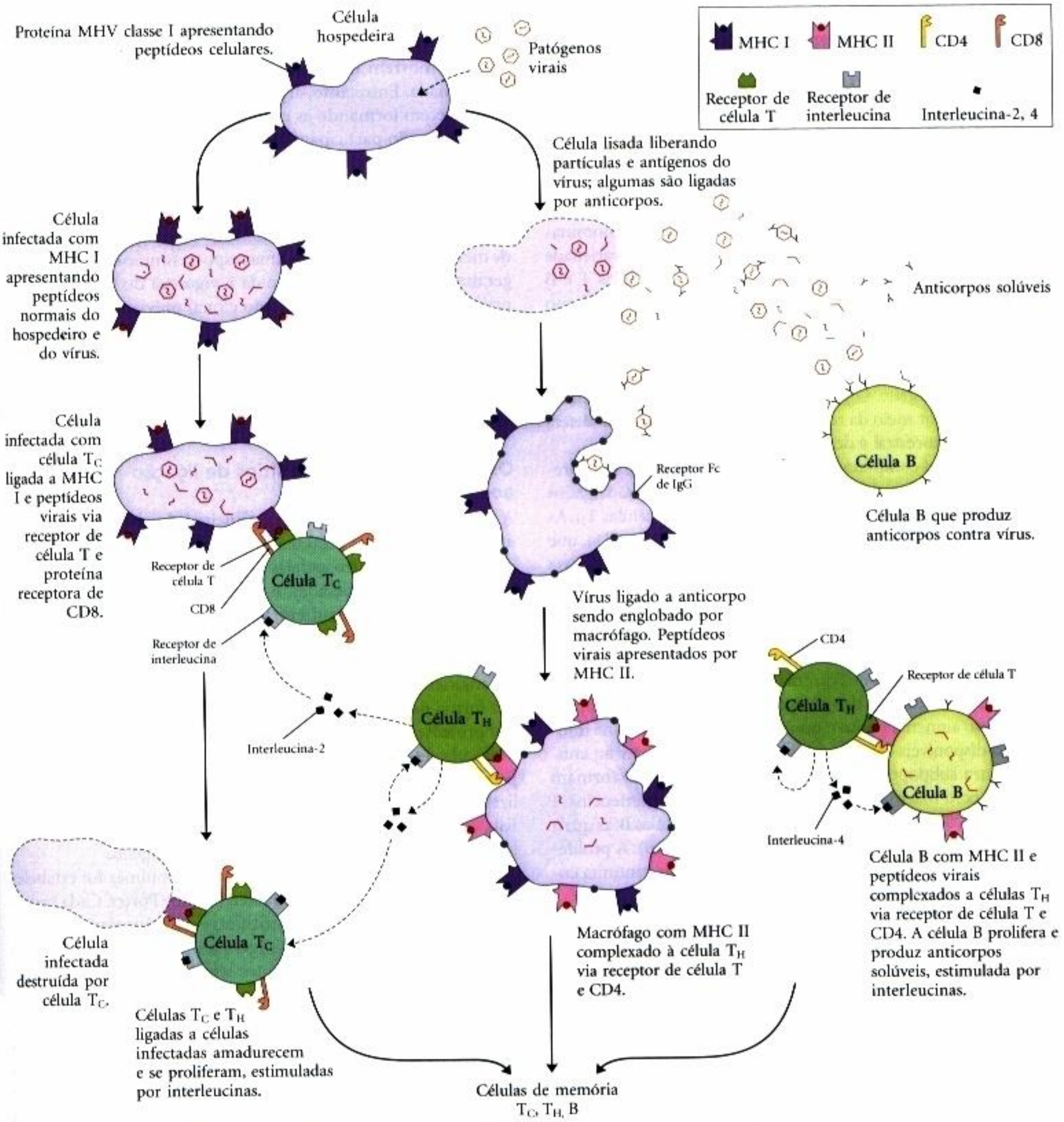

MHC I
MHC II
CD4
CD8
Receptor de célula T
Receptor de interleucina
Interleucina-2, 4
Proteína MHV classe I apresentando peptídeos celulares.
Célula hospedeira
Patógenos virais
Célula infectada com MHC I apresentando peptídeos normais do hospedeiro e do vírus.
Célula lisada liberando partículas e antígenos do vírus; algumas são ligadas por anticorpos.
Anticorpos solúveis
Célula infectada com célula T_C ligada a MHC I e peptídeos virais via receptor de célula T e proteína receptora de CD8.
Receptor Fc de IgG
Célula B
Célula B que produz anticorpos contra vírus.
Receptor de célula T
CD8
Receptor de interleucina
Célula T_C
Vírus ligado a anticorpo sendo englobado por macrófago. Peptídeos virais apresentados por MHC II.
CD4
Receptor de célula T
Célula T_H
Interleucina-2
Célula T_H
Célula B
Interleucina-4
Célula B com MHC II e peptídeos virais complexados a células T_H via receptor de célula T e CD4. A célula B prolifera e produz anticorpos solúveis, estimulada por interleucinas.
Célula T_C
Célula infectada destruída por célula T_C.
Células T_C e T_H ligadas a células infectadas amadurecem e se proliferam, estimuladas por interleucinas.
Macrófago com MHC II complexado à célula T_H via receptor de célula T e CD4.
Células de memória
T_C, T_H, B

Figura 7-22 – Visão geral da resposta imunológica a uma infecção viral. Os passos individuais estão descritos no texto.

Os complexos proteínas MHC classe I–peptídeo em células infectadas são reconhecidos como estranhos e ligados pelas células T_C que expressam receptores de célula T dotados da especificidade de ligação adequada. Os receptores das células T respondem somente aos peptídeos antigênicos formadores de complexos com proteínas MHC classe I. As células T_C têm um receptor adicional, **CD8**, também denominado co-receptor, que intensifica as interações de ligação dos receptores das células T e proteínas MHC (Fig. 7-22, no meio, à esquerda). As células T_C justificam seu nome de células T assassinas ("killer"), pois destroem as células infectadas com vírus, com os quais formaram um complexo por meio de seus receptores de célula T. A morte celular é provocada por vários mecanismos, nem todos bem compreendidos. Um mecanismo envolve a liberação de uma proteína denominada **perforina**, que se liga à membrana plasmática da célula-alvo e se agrega a ela, formando poros moleculares que destroem a capacidade dessa célula de regular seu meio interno. As células T_C também induzem um processo denominado **morte celular programada**, ou **apoptose**, em que as células que formam complexos com as células T_C passam por mudanças metabólicas que rapidamente conduzem à sua morte.

As células T_C com especificidade adequada precisam proliferar seletivamente, quando há necessidade de destruir um grande número de células infectadas com vírus. Para esse fim, células T_C complexadas a uma célula infectada passam a expressar, na sua superfície, receptores para as proteínas sinalizadoras denominadas **interleucinas**. As interleucinas, secretadas por uma variedade de células, estimulam a proliferação somente das células T e B dotadas dos receptores específicos para essas interleucinas. Como as células T e B somente produzem receptores de interleucinas ao formarem um complexo com um antígeno, as únicas células do sistema imunológico que proliferam são as poucas capazes de responder a esse antígeno. O processo da produção de uma população de células por meio da reprodução estimulada de uma determinada célula ancestral é denominado **seleção clonal**.

Os peptídeos complexados a proteínas MHC classe II e apresentados na superfície de macrófagos e de linfócitos B são ligados de modo semelhante por receptores de célula T das células T_H. As células T_H também possuem um receptor denominado **CD4**, que intensifica as interações de ligação dos receptores da célula T. Essa interação geral de ligações, conjuntamente com sinais moleculares secundários que, presentemente, estão sendo identificados, ativa as células T_H. Uma subpopulação de células T_H ativadas secreta uma pequena proteína sinalizadora denominada interleucina-2 (IL-2; M_r 15.000), que estimula a proliferação de células T_C e T_H vizinhas possuidoras dos receptores para interleucina apropriados. Isso aumenta muito o número de células do sistema imunológico disponíveis capazes de reconhecer e responder ao antígeno. Outra subpopulação de células T_H ativadas que formam complexo com macrófagos ou linfócitos B secreta interleucina-4 (IL-4; M_r 20.000), que estimula a proliferação de células B, as quais reconhecem o antígeno (Fig. 7-22, à direita, embaixo). A proliferação das células B, T_C e T_H que estão respondendo continua enquanto o antígeno adequado estiver presente.

As células B em proliferação promovem a destruição de quaisquer vírus ou células bacterianas extracelulares. Primeiro, elas secretam grandes quantidades de anticorpo solúvel, o qual se liga ao antígeno. Esse anticorpo ligado recruta um sistema de cerca de 20 proteínas celulares, coletivamente denominadas **complemento**, porque elas complementam e intensificam a ação dos anticorpos. As proteínas do complemento destroem as capas de muitos vírus ou, em infecções bacterianas, produzem furos na parede celular das bactérias causando seu intumescimento e rompimento por choque osmótico.

Diferentemente das células T, as células B não passam por uma seleção no timo para eliminar as produtoras de anticorpos que reconhecem proteínas do hospedeiro (próprio). Entretanto, as células B não contribuem de modo significativo para a resposta imunológica, a menos que sua proliferação seja estimulada por células T_H. As células T_H *passam* por uma seleção no timo, na qual são eliminadas todas as células T_H capazes de estimular células B produtoras de anticorpos potencialmente perigosos para o hospedeiro.

As próprias células T_H participam somente de modo indireto da destruição de células infectadas e de patógenos, mas seu papel é crítico para a resposta imune em seu todo. Isso é ilustrado de modo dramático pela epidemia produzida pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana), o vírus que causa a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida). Os alvos primários da infecção pelo HIV são as células T_H. A eliminação dessas células incapacita progressivamente todo o sistema imune.

Uma vez esgotado o antígeno, geralmente as células imune ativadas morrem em uma questão de dias, por morte celular programada. Entretanto, algumas das células B e T estimuladas amadurecem formando as **células de memória**. Essas células de vida longa não participam diretamente da resposta imune primária quando o antígeno é encontrado pela primeira vez. Em vez disso, elas se tornam residentes permanentes do sangue, prontas para responder a um novo reaparecimento do mesmo antígeno. Quando novamente desafiadas pelo antígeno, as células de memória podem montar uma resposta imune secundária que, geralmente, é muito mais rápida e vigorosa do que a resposta primária, por causa da expansão clonal prévia. Por meio desse mecanismo, uma vez expostos a um vírus ou outro patógeno, os vertebrados podem responder rapidamente ao patógeno. Essa é a base da imunidade de longa duração conferida por vacinas e imunidade natural após infecções repetidas pela mesma cepa de um vírus.

Os anticorpos têm dois sítios de ligação aos antígenos idênticos

A **imunoglobulina G (IgG)** é a principal classe de moléculas de anticorpo e uma das proteínas mais abundantes do soro do sangue. A IgG tem quatro cadeias polipeptídicas: duas grandes, denominadas cadeias pesadas, e duas leves, interligadas por ligações covalentes e dissulfeto formando um complexo de M_r 150.000. As cadeias pesadas de uma molécula de IgG interagem em uma das extremidades, depois se ramificam interagindo separadamente com as cadeias leves e formando uma molécula em forma de Y (Fig. 7-23). A imunoglobulina pode ser clivada por proteases na região da "dobradiça" que separa a base de uma molécula de IgG de seus "braços". A clivagem com a protease papaína libera o fragmento da base, denominado **Fc**, por cristalizar-se prontamente, e os dois ramos ("braços"), denominados **Fab**, que são os fragmentos ligadores do antígeno. Cada "braço" tem um único sítio combinatório com o antígeno.

A estrutura fundamental das imunoglobulinas foi estabelecida primeiro por Gerald Edelman e Rodney Porter. Cada cadeia é constituída por domínios identificáveis; alguns têm seqüência e estrutura constantes de uma IgG para a próxima, outros são variáveis. Os domínios constantes têm uma estrutura característica denominada **alça da imunoglobulina**, um motivo estrutural bem conservado em toda a classe β. Em cada cadeia pesada há três desses domínios constantes e um em cada cadeia leve. As cadeias pesada e leve também têm um domínio variável cada uma, no qual se observa a maior parte da variabilidade na seqüência de resíduos de aminoácidos. Os domínios variáveis associam-se para formar o sítio de ligação do antígeno (Fig. 7-24).

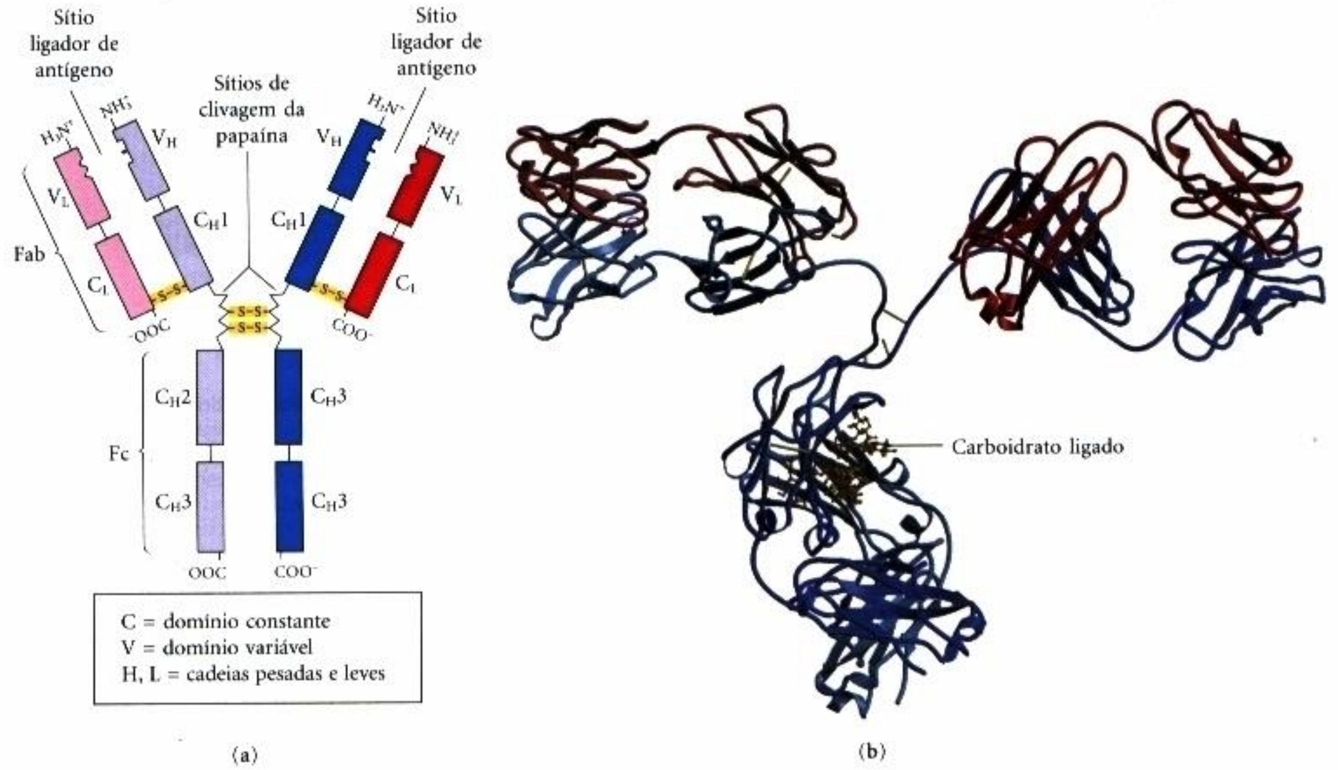

Sítio ligador de antígeno
Sítio ligador de antígeno
Sítios de clivagem da papaína
H_3N^+
NH_3^+
V_H
V_H
V_L
V_L
C_H1
C_H1
Fab
C_L
C_L
S–S
S–S
S–S
S–S
^-OOC
COO^-
C_H2
C_H3
Fc
C_H3
C_H3
OOC
COO^-
C = domínio constante
V = domínio variável
H, L = cadeias pesadas e leves
(a)
Carboidrato ligado
(b)

Figura 7-23 – A estrutura da imunoglobulina G. (**a**) Pares de cadeias pesadas e leves combinam-se formando uma molécula em Y. Formam-se dois sítios combinatórios de antígeno pela associação de domínios variáveis de uma cadeia leve (V_L) com os de outra pesada (V_H). A clivagem com papaína separa a porção Fab da porção Fc da proteína na "dobradiça". A porção Fc da molécula também contém carboidratos associados. (**b**) Um modelo em fita da primeira molécula de IgG completa a ser cristalizada e analisada estruturalmente. Apesar de essa molécula conter duas cadeias pesadas idênticas (duas tonalidades de azul) e duas cadeias leves idênticas (duas tonalidades de vermelho), ela se cristalizou na conformação assimétrica mostrada. A flexibilidade da conformação pode ser importante para a função das imunoglobulinas.

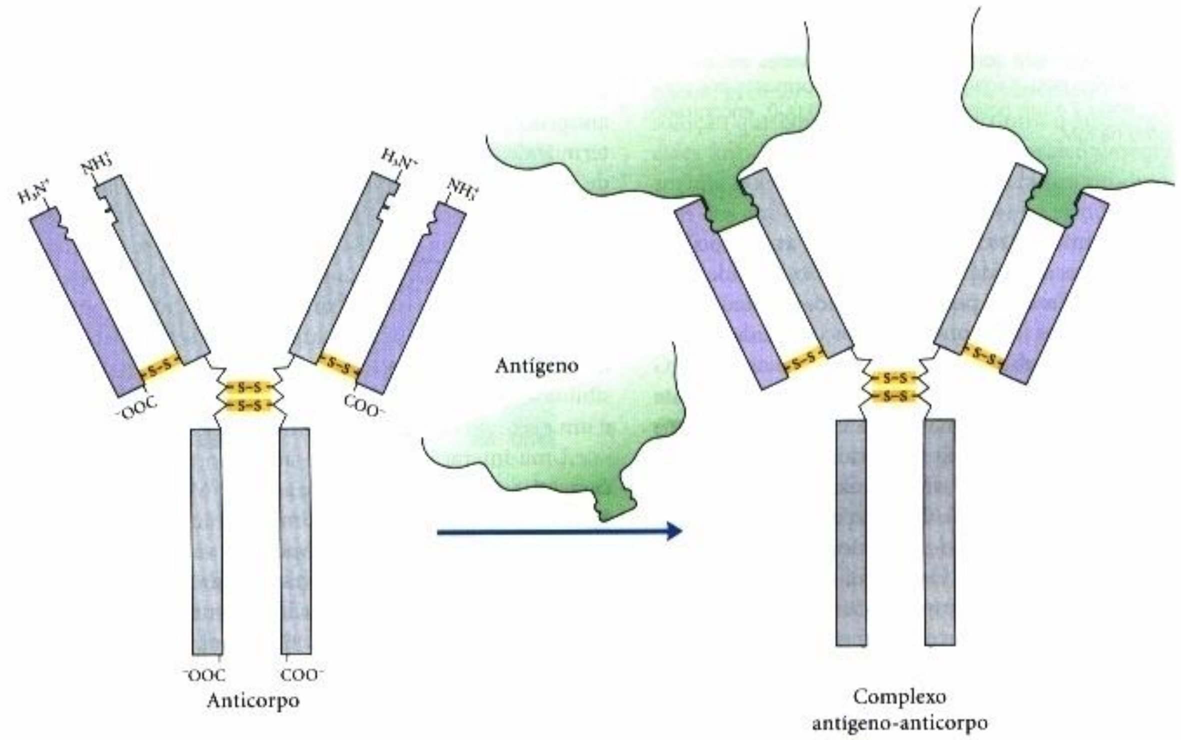

H_3N^+
NH_3^+
H_3N^+
NH_3^+
S–S
S–S
S–S
S–S
^-OOC
COO^-
Antígeno
^-OOC
COO^-
Anticorpo
Complexo antígeno-anticorpo

Figura 7-24 – Ligação de IgG a um antígeno. A fim de criar um ajuste ótimo para o antígeno, com freqüência os sítios de ligação da IgG passam por pequenas mudanças de conformação. Tal ajuste induzido é comum a muitas interações proteína-ligante.

Em muitos vertebrados, a IgG é somente uma de cinco classes de imunoglobulinas. Cada classe tem um tipo característico de cadeia pesada, denominadas α, δ, ε, γ e μ para IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Dois tipos de cadeia leve, κ e λ, ocorrem em todas as classes de imunoglobulinas. As estruturas gerais de **IgD** e **IgE** são semelhantes à da IgG. A **IgM** apresenta-se ou sob a forma de um monômero preso à membrana, ou sob a forma secretada que é essa estrutura básica que está na forma de um pentâmero, mantido por meio de ligações cruzadas (Fig. 7-25). A **IgA**, encontrada principalmente em secreções como a saliva, lágrima e leite, pode-se apresentar nas formas de monômero, dímero ou trímero. A IgM é o primeiro anticorpo a ser sintetizado pelos linfócitos B e o principal anticorpo nos estágios iniciais da resposta imunológica primária. Algumas células B logo começam a produzir IgD (com o mesmo sítio de ligação de antígeno que a IgM produzida pela mesma célula), mas a função característica da IgD é menos clara.

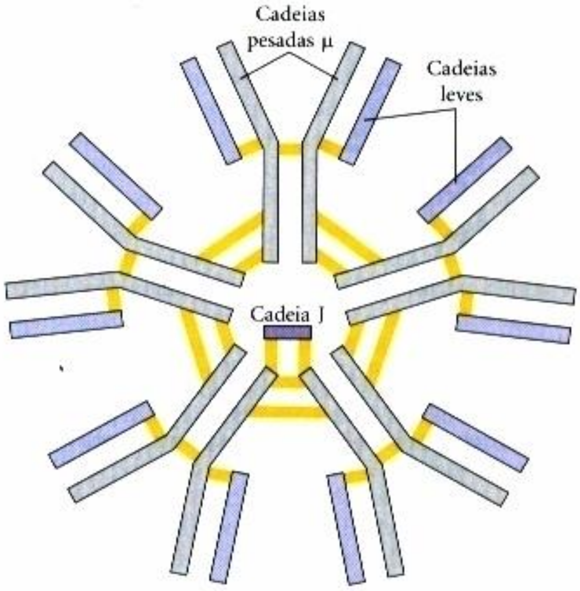


Figura 7-25 – Pentâmero IgM constituído por unidades de imunoglobulina. O pentâmero possui ligações transversais formadas por pontes dissulfeto. A cadeia J é um polipeptídeo de M_r 20.000, encontrado tanto na IgA como na IgM.

A IgG descrita anteriormente é o principal anticorpo das respostas imunológicas secundárias, as quais são iniciadas por células B de memória. Fazendo parte da imunidade atual do organismo contra antígenos já encontrados e reconhecidos, a IgG é a imunoglobulina mais abundante do sangue. Quando a IgG se liga a uma bactéria ou a um vírus invasor, ela não somente ativa o sistema do complemento, mas também certos leucócitos como os macrófagos, para englobar e destruir o invasor. Ainda outra classe de receptores da superfície celular dos macrófagos reconhece e liga a região Fc da IgG. Quando esses receptores Fc se ligam a um complexo anticorpo-patógeno, o macrófago engloba o complexo por fagocitose (Fig. 7-26).

A IgE desempenha um papel importante na resposta alérgica, interagindo com basófilos (leucócitos fagocitários) do sangue e com células secretoras de histamina denominadas mastócitos, amplamente distribuídas nos tecidos. Essa imunoglobulina se liga a basófilos e mastócitos por meio de receptores Fc especiais, presentes na superfície dessas células. Dessa forma, a IgE serve como uma espécie de receptor para o antígeno. Quando o antígeno se liga, as células são induzidas a secretar histamina e outras aminas biologicamente ativas, que causam dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sangüíneos. Acredita-se que esses efeitos sobre os vasos sangüíneos facilitem o movimento de células do sistema imunológico e de proteínas para os locais de inflamação. Elas também produzem os sintomas normalmente associados com as alergias. O pólen ou outros alérgenos são reconhecidos como estranhos, o que desencadeia uma resposta imunológica normalmente reservada para os patógenos.

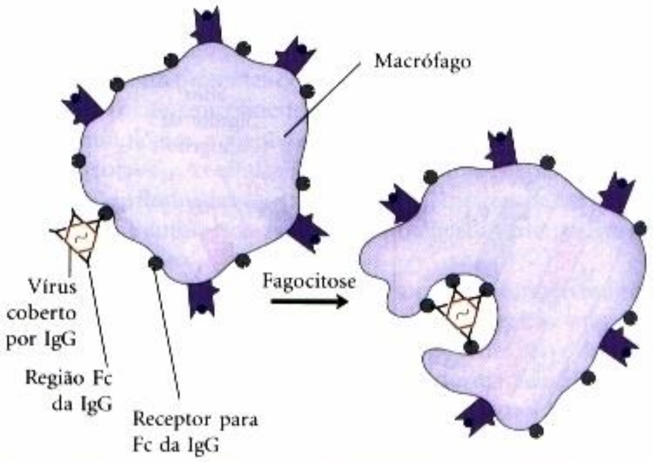


Figura 7-26 – Fagocitose de um vírus ligado a um anticorpo por um macrófago. As regiões Fc dos anticorpos ligam-se aos receptores Fc da superfície do macrófago, induzindo o macrófago a englobar e destruir o vírus.

Os anticorpos ligam-se firme e especificamente aos antígenos

A especificidade da ligação de um anticorpo é determinada pelos resíduos de aminoácidos no domínio variável de suas cadeias pesadas e leves. Muitos resíduos desses domínios são variáveis, mas o são de modo desigual. Alguns, particularmente os que constituem o sítio de ligação ao antígeno, são hipervariáveis, sendo especialmente provável que sejam diferentes. A especificidade é conferida pela complementaridade química entre o antígeno e seu sítio combinatório específico no anticorpo, em termos de forma e localização dos grupos com carga, apolares e de pontes de hidrogênio. Por exemplo, um sítio de ligação com um grupo com carga negativa pode ligar um antígeno com uma carga positiva na posição complementar. Em muitos casos, a complementaridade é alcançada de modo interativo, pois, durante a aproximação do ligante, as estruturas do antígeno e do sítio de ligação se influenciam mutuamente. Ocorrem, então, mudanças de conformação do anticorpo e/ou antígeno que possibilitam a interação completa dos grupos complementares. Esse é um exemplo de ajuste induzido (Fig. 7-27).

Uma interação anticorpo-antígeno típica é bastante forte, caracterizada por valores K_d de até 10^{-10}M (lembre-se de que um K_d mais baixo corresponde a uma interação de ligação mais forte). O K_d reflete a energia derivada das várias interações iônicas, pontes de hidrogênio, hidrofóbicas e de van der Waals, que estabilizam a ligação. A energia de ligação necessária para produzir um K_d de 10^{-10}M é de cerca de 65kJ/mol.

Um complexo constituído por um peptídeo derivado do HIV (um modelo de antígeno) e uma molécula Fab ilustra algumas dessas propriedades (Fig. 7-27). Neste exemplo, são particularmente notáveis as mudanças da estrutura observadas na ligação do antígeno.

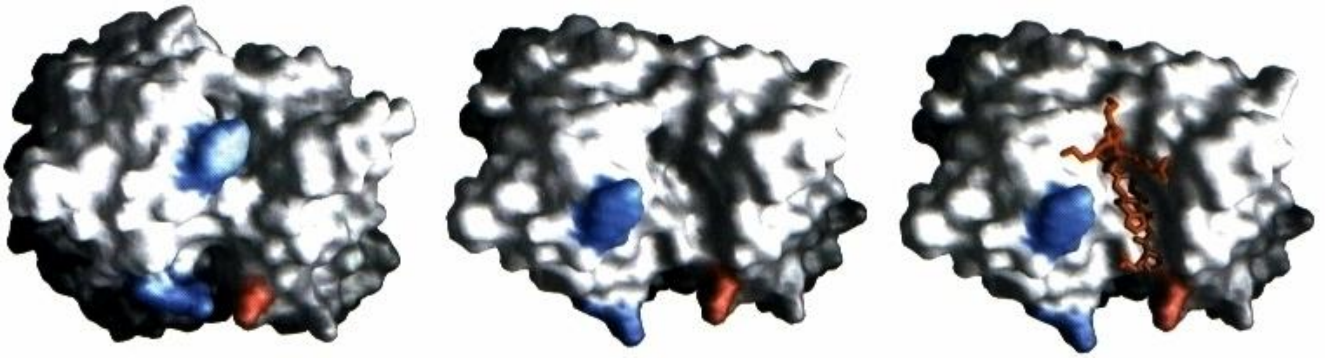


Figura 7-27 – Ajuste induzido da ligação de um antígeno à IgG. A molécula, mostrada em seu contorno de superfície, é o fragmento Fab de uma IgG. O antígeno que essa IgG liga é um peptídeo pequeno derivado do HIV. Dois resíduos da cadeia pesada (azul) e um da cadeia leve (rosa) estão em cor a fim de criar pontos de referência visual. (**a**) Vista do fragmento Fab olhando de cima para baixo para o sítio de ligação do antígeno. (**b**) Mesma vista, mas aqui o fragmento Fab está na conformação "ligada"; o antígeno foi omitido da imagem para que a vista do sítio de ligação alterado não fosse obstruída. Note como houve aumento da cavidade de ligação e vários grupos mudaram de posição. (**c**) Mesma vista que em (**b**), mas com o antígeno no sítio de ligação representado por uma estrutura como um bastão vermelho.

A interação anticorpo-antígeno é a base de uma variedade de importantes procedimentos analíticos

A extraordinária afinidade e especificidade da ligação dos anticorpos os tornam valiosos reagentes analíticos. Dois tipos de preparação de anticorpos estão em uso: policlonais e monoclonais. Os **anticorpos policlonais** são os produzidos por muitos linfócitos B diferentes respondendo a um antígeno, como por exemplo uma proteína injetada em um animal. Células da população de linfócitos B produzem anticorpos que ligam diferentes epitopos específicos dentro do antígeno. Portanto, as preparações policlonais contêm uma mistura de anticorpos que reconhecem diferentes partes da proteína. Os **anticorpos monoclonais**, diferentemente, são sintetizados por uma população de células B idênticas (um **clone**), crescidas em cultura de células. Esses anticorpos são homogêneos, e todos reconhecem o mesmo epitopo. As técnicas para a produção de anticorpos monoclonais foram desenvolvidas por Georges Köhler e Cesar Milstein.

Georges Köhler

Cesar Milstein

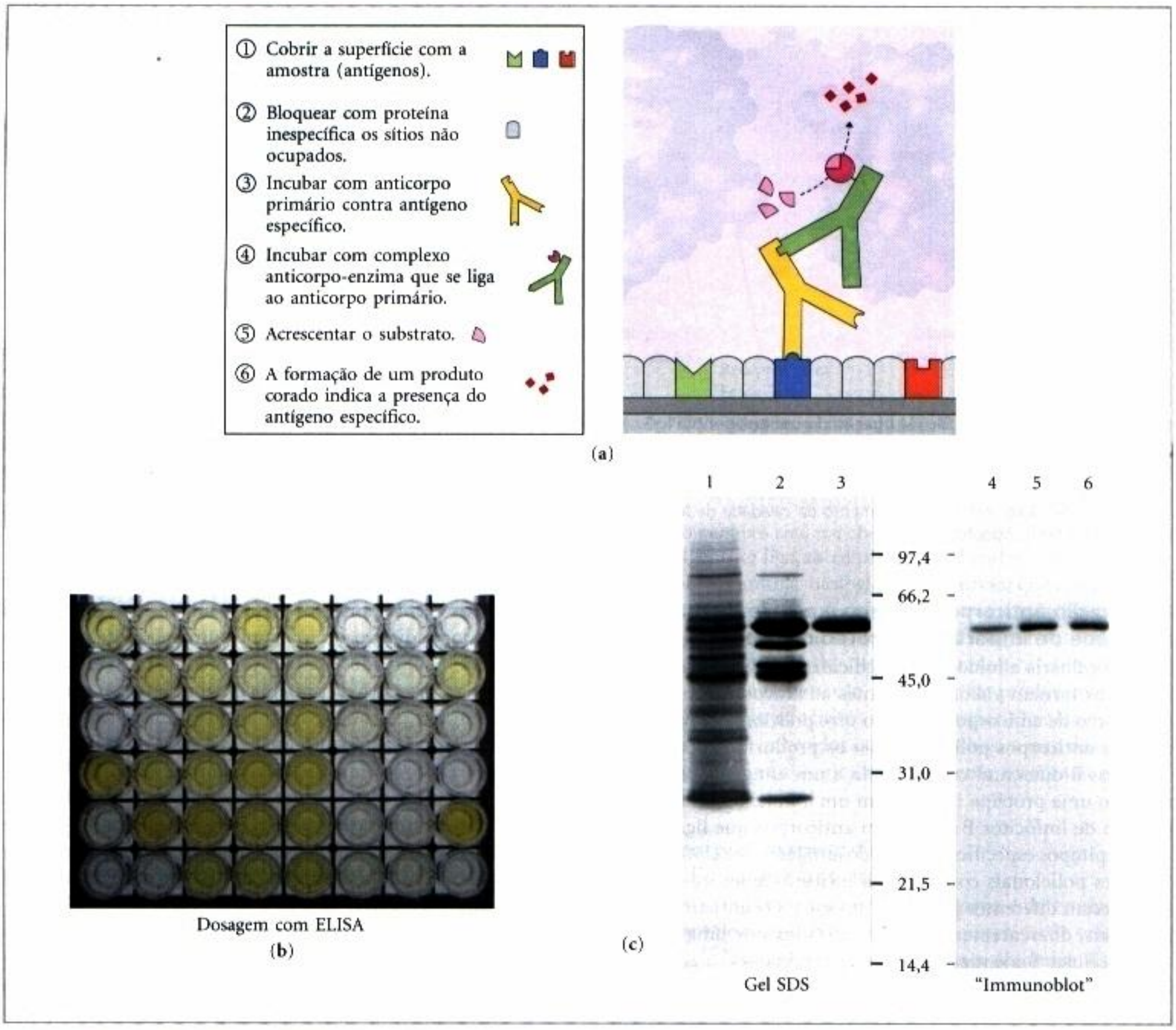
A especificidade dos anticorpos tem usos práticos. Um anticorpo selecionado pode ser acoplado covalentemente a uma resina e usado como uma coluna cromatográfica de afinidade do tipo mostrado na Figura 5-18c. Quando uma mistura de proteínas é adicionada à coluna, o anticorpo ligará especificamente sua proteína-alvo e a reterá na coluna, enquanto as outras proteínas serão removidas. A proteína-alvo pode, então, ser eluída da resina por uma solução salina ou por algum outro agente. Essa é uma ferramenta poderosa para a purificação de proteínas.

Em outra técnica analítica versátil, um anticorpo é ligado a um marcador radiativo ou a algum outro reagente que torna fácil detectá-lo. Quando o anticorpo prende a proteína-alvo, a marca revela a presença da proteína em uma solução, ou sua localização em um gel, ou até mesmo uma célula viva. Algumas variações desse procedimento estão ilustradas na Figura 7-28.

O teste **ELISA** ("enzyme-linked immunosorbent assay") possibilita uma detecção rápida e a quantificação da presença de um antígeno em uma amostra (Fig. 7-28b). As proteínas de uma amostra são adsorvidas a uma superfície inerte, em geral os poços de uma placa de poliestireno com 96 poços. A superfície é lavada com uma solução de uma proteína qualquer (freqüentemente caseína obtida de leite em pó seco e desnatado), para impedir, nas etapas subseqüentes, que outras proteínas sejam adsorvidas a essas superfícies. A superfície é, então, tratada com uma solução que contém o anticorpo primário — um anticorpo contra a proteína na qual se tem interesse. Os anticorpos que não se prenderam são lavados e a superfície é tratada com uma solução que contém anticorpos contra o anticorpo primário. A esses anticorpos secundários está covalentemente ligada uma enzima que catalisa a reação que gera um produto corado. Depois dos anticorpos secundários serem removidos por lavagem, é adicionado o substrato do anticorpo acoplado à enzima. A formação do produto (monitorada pela intensidade da cor) é proporcional à concentração da proteína na amostra que interessa ao pesquisador.

Em um **ensaio de transferência de antígenos** (do inglês "**immunoblot**") (Fig. 7-28c), as proteínas que foram isoladas por eletroforese em gel são transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose. Essa membrana é bloqueada (como descrito anteriormente para o teste ELISA), tratada sucessivamente com anticorpo primário, anticorpo secundário acoplado à enzima e, finalmente, ao substrato. Um precipitado corado forma-se somente na banda que contém a proteína de interesse. A transferência de antígenos possibilita a detecção de um pequeno componente de uma amostra e dá uma indicação aproximada de seu peso molecular.

Em capítulos posteriores examinaremos outros aspectos relativos aos anticorpos. Eles são extremamente importantes em medicina e podem informar-nos muito sobre a estrutura das proteínas e sua ação sobre os genes.



① Cobrir a superfície com a amostra (antígenos).

② Bloquear com proteína inespecífica os sítios não ocupados.

③ Incubar com anticorpo primário contra antígeno específico.

④ Incubar com complexo anticorpo-enzima que se liga ao anticorpo primário.

⑤ Acrescentar o substrato.

⑥ A formação de um produto corado indica a presença do antígeno específico.

Figura 7-28 – Técnicas com anticorpos. A reação específica de um anticorpo com seu antígeno constitui a base de várias técnicas que permitem identificar e quantificar uma proteína específica em uma amostra complexa. (**a**) Representação esquemática do método geral. (**b**) Um teste com ELISA para pesquisar a presença de anticorpos contra o vírus do herpes (HSV) em amostra de sangue. Os poços foram recobertos com um antígeno HSV, ao qual se ligarão os anticorpos contra HSV do sangue de pacientes. O segundo anticorpo é uma IgG anti-humana ligada à enzima peroxidase. Amostras de sangue com maior quantidade de anticorpos anti-HSV apresentam-se na cor amarelo-vivo. (**c**) Uma transferência de antígenos. As canaletas 1 a 3 provêm de um gel de SDS; amostras de estágios sucessivos da purificação de uma proteína quinase foram separadas e coradas com "Coomassie blue". As faixas 4 a 6 mostram as mesmas amostras, mas estas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose depois de separação em gel de SDS. A membrana foi então desafiada com anticorpo contra a proteína quinase. Os números entre o gel e o "immunoblot" indicam M_r ($\times 10^{-3}$).

Interações entre Proteínas Moduladas por Energia Química: Actina, Miosina e Motores Moleculares

Os organismos movem-se. As organelas e as macromoléculas dentro das células movem-se. A maioria desses movimentos é resultante da atividade de um interessante grupo de motores moleculares constituídos por proteínas. Alimentados por energia química, geralmente derivada da hidrólise do ATP, esses grandes agregados de proteínas motoras passam por mudanças cíclicas de conformação, que se acumulam formando uma força direcional unificada — a diminuta força que separa os cromossomos de uma célula em divisão e a imensa força que faz saltar um gato selvagem que pesa um quarto de tonelada.

Como é fácil de se prever, as interações entre as proteínas motoras dependem de arranjos complementares de forças iônicas, pontes de hidrogênio, hidrofóbicas e de van der Waals nos sítios de ligação das proteínas. Entretanto, nos motores protéicos, essas interações atingem níveis excepcionalmente altos de organização espacial e temporal.

As proteínas motoras formam a base da contração dos músculos, da migração das organelas ao longo dos microtúbulos, da rotação dos flagelos das bactérias e do movimento de certas proteínas ao longo do DNA. Como observamos no Capítulo 2, dentro das células, as proteínas denominadas quinesinas e dineínas movem-se ao longo de microtúbulos, tracionando consigo organelas ou reorganizando os cromossomos durante a divisão celular (veja Fig. 2-19). Uma interação da dineína com microtúbulos leva ao movimento dos flagelos e cílios dos eucariotos. O movimento do flagelo das bactérias envolve um motor rotacional complexo situado na base do flagelo (veja Fig. 19-32). Helicases, polimerases e outras proteínas movem-se ao longo do DNA ao executarem suas funções no metabolismo do DNA (Capítulo 25). Aqui, concentraremos nossa atenção no exemplo bem estudado das proteínas contráteis do músculo esquelético dos vertebrados como um paradigma de como as proteínas traduzem a energia química em movimento.

As principais proteínas do músculo são a miosina e a actina

A força contrátil do músculo é gerada pela interação de duas proteínas, miosina e actina. Essas proteínas se dispõem em filamentos que passam por interações transitórias e deslizam uma pela outra causando a contração. Juntas, a actina e a miosina constituem mais de 80% da massa protéica do músculo.

A **miosina** (M_r 540.000) tem seis subunidades: duas cadeias pesadas (M_r 220.000) e duas cadeias leves (M_r 20.000). As cadeias pesadas são responsáveis por grande parte da estrutura geral. Em sua extremidade carboxila, elas estão dispostas sob a forma de α-hélices enroladas uma em torno da outra formando uma espiral fibrosa com giro para a esquerda, semelhante à da α-queratina (Fig. 7-29a). Em sua extremidade amino, cada cadeia pesada tem um grande domínio globular que contém um sítio no qual o ATP é hidrolisado. As cadeias leves estão associadas aos domínios globulares. Quando a miosina sofre um tratamento brando com a protease tripsina, grande parte da cauda fibrosa é clivada, dividindo a proteína em componentes denominados meromiosinas leve e pesada (Fig. 7-29b). O domínio globular, denominado subfragmento 1 da miosina, ou S1, ou simplesmente o grupo-cabeça da miosina, é liberado da meromiosina pesada por clivagem com papaína. O fragmento S1 produzido por esse procedimento é o domínio motor que possibilita a contração muscular. A estrutura geral do fragmento S1, determinada por Ivan Rayment e Hazel Holden, é mostrada na Figura 7-29c.

Nas células musculares, as moléculas de miosina agregam-se formando estruturas denominadas **filamentos grossos** (Fig. 7-30a). Essas estruturas, semelhantes a bastões, servem de eixo central da unidade contrátil. Dentro do filamento grosso, várias centenas de moléculas de miosina dispõem-se com suas "caudas" fibrosas associadas formando uma longa estrutura bipolar. Os domínios globulares projetam-se de ambas as extremidades dessa estrutura formando conjuntos organizados empilhados em conjuntos regulares.

A segunda proteína muscular importante, a **actina**, é abundante em quase todas as células de eucariotos. No músculo, as moléculas de monômeros de actina, denominadas actina G (actina globular; M_r 42.000), associam-se formando um polímero longo denominado actina F (actina *f*ilamentosa). O **filamento fino** (Fig. 7-30b) consiste de actina F juntamente com as proteínas troponina e tropomiosina. As partes filamentosas dos filamentos finos formam-se com a adição de sucessivas moléculas de monômeros de actina a uma extremidade. Além disso, cada monômero prende ATP, e depois o hidrolisa em ADP, de modo que todas as moléculas de actina do filamento formam um complexo com o ADP. Entretanto, essa hidrólise do ATP pela actina funciona somente na montagem dos filamentos; ela não contribui diretamente para a energia gasta na contração muscular. Cada monômero de actina do filamento fino pode ligar-se de modo firme e específico a uma cabeça de miosina (Fig. 7-30c).

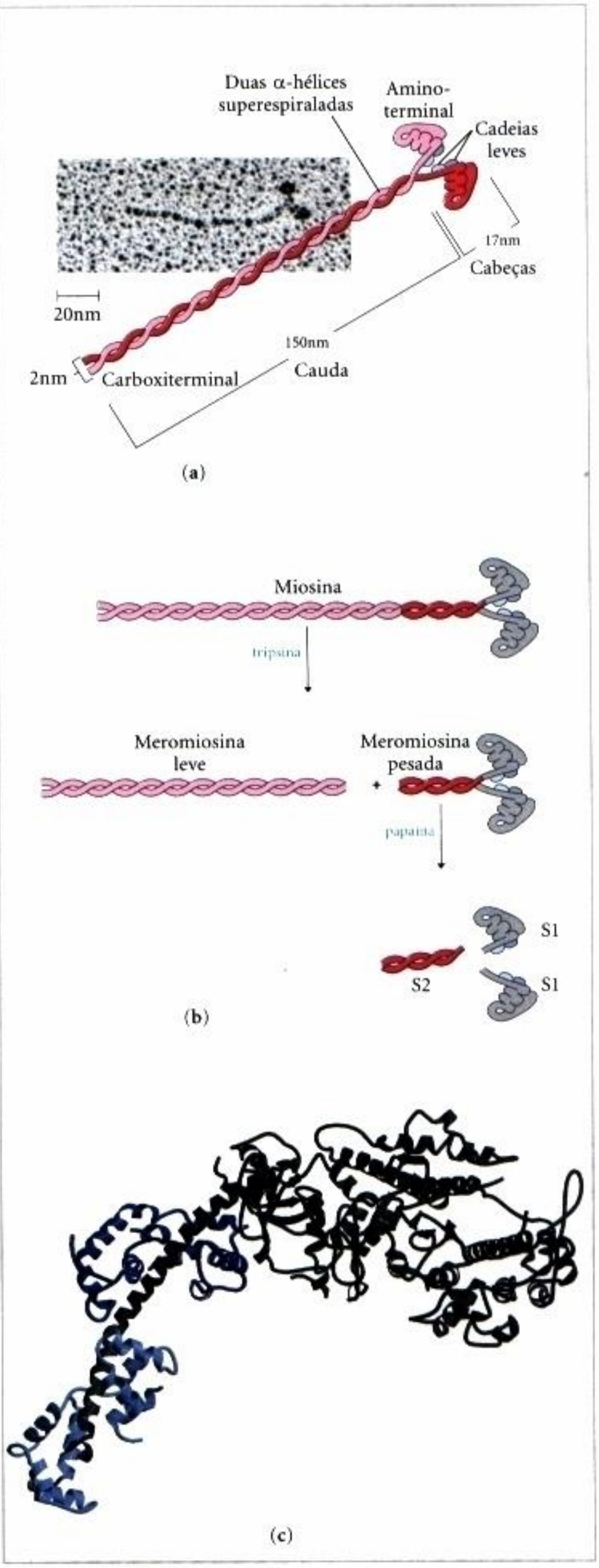
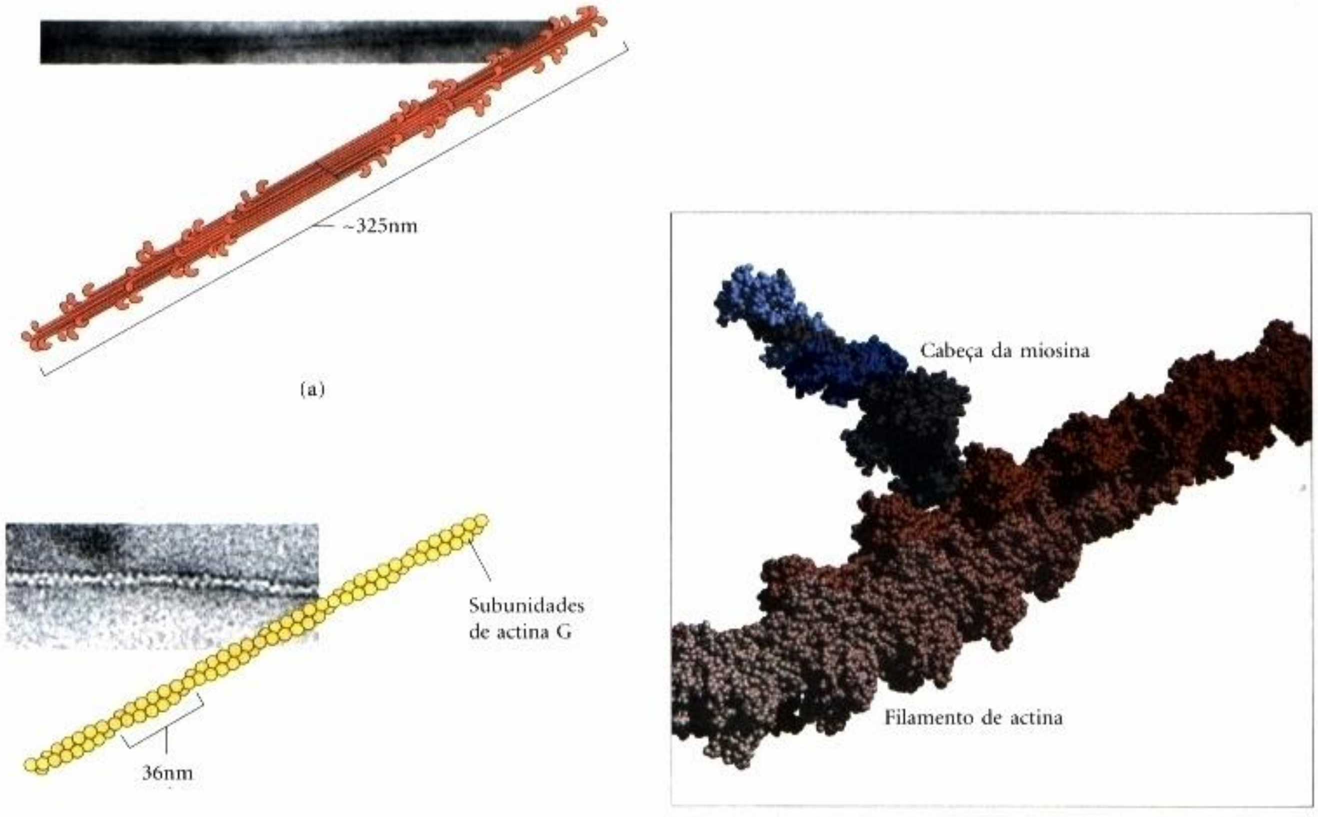


Figura 7-29 – Miosina. (**a**) A miosina tem duas cadeias pesadas (em duas tonalidades de rosa), o carboxiterminal forma uma espiral extensa (cauda) e o aminoterminal contém domínios globulares (cabeças). Duas cadeias leves (em azul) estão associadas a cada cabeça da miosina. (**b**) A clivagem com tripsina e papaína separa as cabeças da miosina (fragmentos S1) das caudas. (**c**) Representação em fita do fragmento S1 da miosina. A cadeia pesada está em cinza, as duas cadeias leves em duas tonalidades de azul.



(a) (b) (c)

Figura 7-30 – Principais componentes do músculo. (**a**) A miosina agrega-se formando uma estrutura bipolar denominada filamento grosso. (**b**) A actina F é uma estrutura filamentosa resultante da montagem de monômeros de actina G, os quais se polimerizam dois a dois, dando o aspecto de uma espiral com um monômero girando em torno do outro, para a direita. São mostrados uma micrografia eletrônica e um modelo de actina F. (**c**) Modelo espaço-cheio de um filamento de actina (vermelho) com uma cabeça de miosina (cinza e duas tonalidades de azul) ligada a um monômero de actina, dentro do filamento.

Proteínas adicionais organizam os filamentos finos e grossos em estruturas ordenadas

O músculo é constituído de feixes paralelos de **fibras musculares**. Cada fibra é uma única célula multinucleada, muito grande, com 20 a 100μm de diâmetro, resultante da fusão de muitas células e, com freqüência, cobre toda a extensão do músculo. Cada fibra, por sua vez, contém cerca de 1.000 **miofibrilas,** com 2μm de diâmetro, cada uma das quais consistindo de um grande número de filamentos grossos e finos, dispostos de modo regular, e que formam complexos com outras proteínas (Fig. 7-31). Um sistema de vesículas membranosas achatadas, denominado **retículo sarcoplasmático**, envolve cada miofibrila. Examinadas ao microscópio eletrônico, as fibras musculares apresentam regiões alternadas de densidade eletrônica alta e baixa, denominadas **bandas A** e **I** (Fig. 7-31b, c). As bandas A e I originam-se da disposição dos filamentos grossos e finos, que estão alinhados e parcialmente superpostos. A banda I é a região do feixe que, em secção transversal, contém somente filamentos finos. A banda A, mais escura, ocupa todo o comprimento do filamento grosso e inclui a região na qual os filamentos grossos e finos se superpõem. Uma estrutura delgada, denominada **disco Z**, perpendicular aos filamentos finos, divide a banda I em duas metades e serve de âncora à qual os filamentos finos se prendem. A banda A também é dividida em duas metades por uma linha fina, a **linha M**, ou disco M, uma região com alta densidade eletrônica situada na metade dos filamentos grossos. Toda a unidade contrátil, constituída por feixes de filamentos grossos intercalados, em ambas as extremidades, com feixes de filamentos finos, é denominada **sarcômero.** A disposição intercalada dos feixes possibilita aos filamentos grossos e finos deslizarem uns pelos outros (por meio de um mecanismo discutido a seguir), levando a um encurtamento de cada sarcômero (Fig. 7-32).

Em uma de suas extremidades, os filamentos finos estão presos ao disco Z em um padrão regular. A montagem inclui as proteínas menores do músculo, **α-actinina, desmina** e **vimentina.** Os filamentos finos também contêm uma proteína grande denominada **nebulina** (~7.000 resíduos de aminoácidos), que se acredita estar estruturada como uma hélice que alcança todo o comprimento do filamento. De modo semelhante, a linha M organiza os filamentos grossos. Ela contém as proteínas **paramiosina, proteína C** e **proteína M.** Outra classe de proteínas denominadas **titinas**, que são as maiores cadeias de polipeptídeos individuais conhecidas (a titina do músculo cardíaco humano tem 26.926 resíduos de aminoácidos), une os filamentos grossos ao disco Z, dando uma organização adicional à estrutura geral. Entre suas funções estruturais, acredita-se que as proteínas nebulina e titina atuem como "maestros moleculares", regulando o comprimento dos filamentos finos e grossos, respectivamente. A titina estende-se do disco Z até a linha M, regulando o comprimento do próprio sarcômero e impedindo uma extensão excessiva do músculo. Nos organismos vertebrados, o comprimento característico do sarcômero varia de um músculo para outro, o que é atribuído à expressão de diferentes variantes de titina.

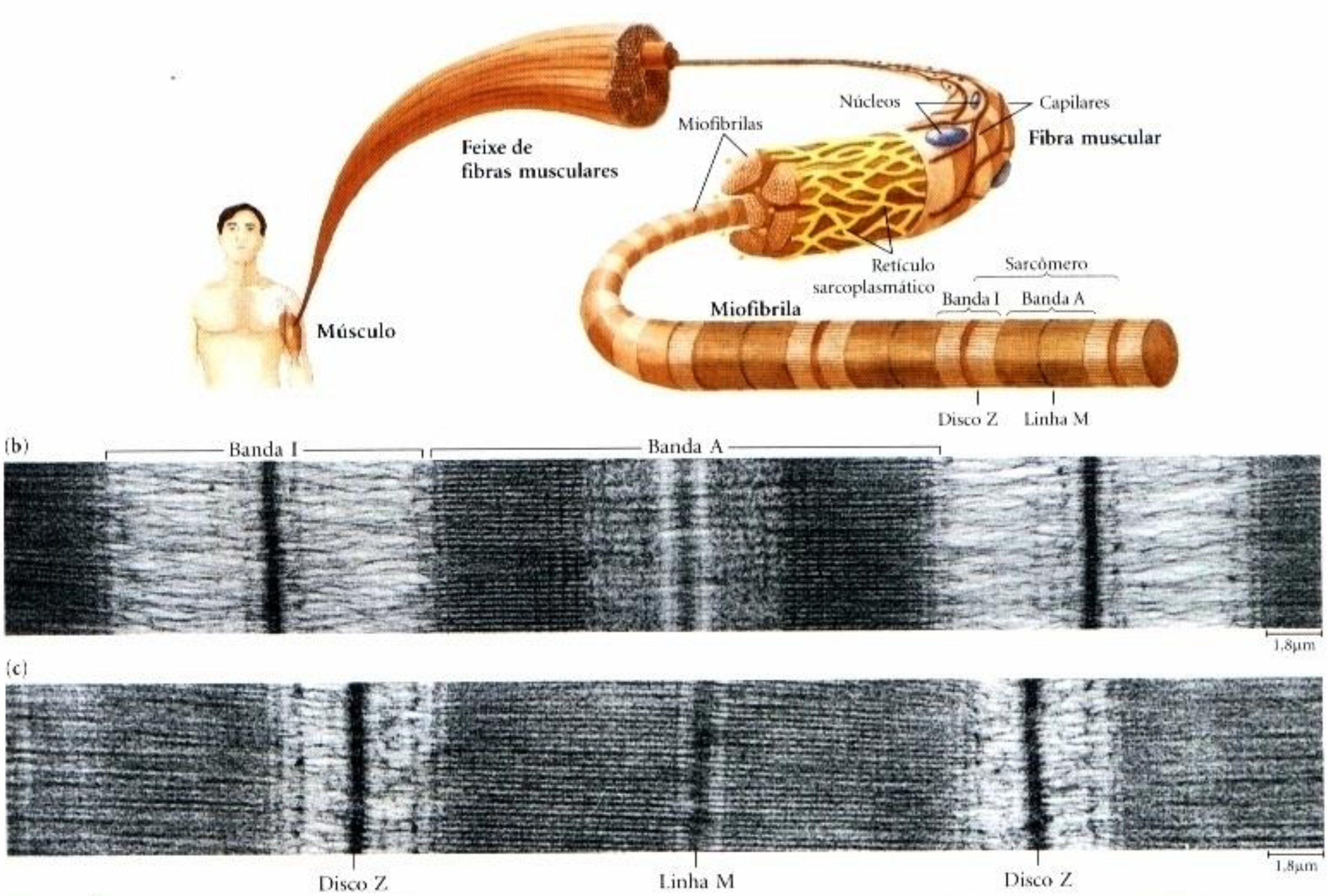
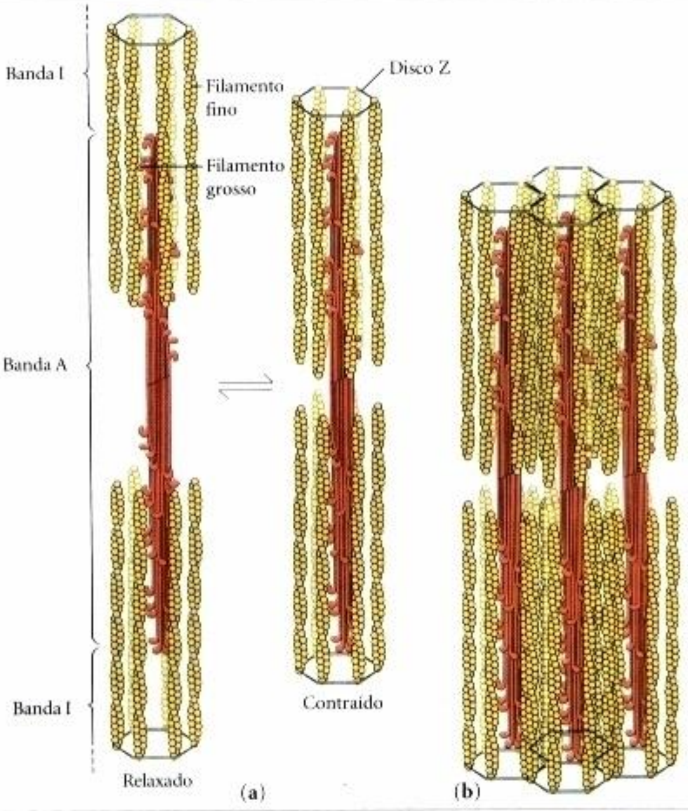

Núcleos
Capilares
Miofibrilas
Fibra muscular
Feixe de fibras musculares
Retículo sarcoplasmático
Sarcômero
Banda I
Banda A
Miofibrila
Músculo
Disco Z
Linha M
(b)
Banda I
Banda A
1,8μm
(c)
Disco Z
Linha M
Disco Z
1,8μm

Figura 7-31 – Estrutura do músculo esquelético. (**a**) As fibras musculares são constituídas por células multinucleadas, alongadas e individuais, provenientes da fusão de muitas células precursoras. Dentro das fibras há muitas miofibrilas envolvidas pelo retículo sarcoplasmático membranoso. A organização dos filamentos grossos e finos da miofibrila dá a esta um aspecto estriado. Quando o músculo se contrai, as bandas I ficam mais estreitas e os discos Z se aproximam, como visto nas micrografias eletrônicas de músculo relaxado (**b**) e contraído (**c**).

Figura 7-32 – Contração muscular. Os filamentos grossos são estruturas bipolares criadas pela associação de muitas moléculas de miosina. (**a**) A contração muscular ocorre pelo deslizamento dos filamentos grossos e finos uns pelos outros, o que resulta na aproximação dos discos Z de bandas I vizinhas. (**b**) Os filamentos grossos e finos se intercalam de tal modo que cada filamento grosso é circundado por seis filamentos finos.


Banda I
Filamento fino
Disco Z
Filamento grosso
Banda A
Banda I
Contraído
Relaxado
(a)
(b)

Os filamentos grossos de miosina deslizam ao longo dos filamentos finos de actina

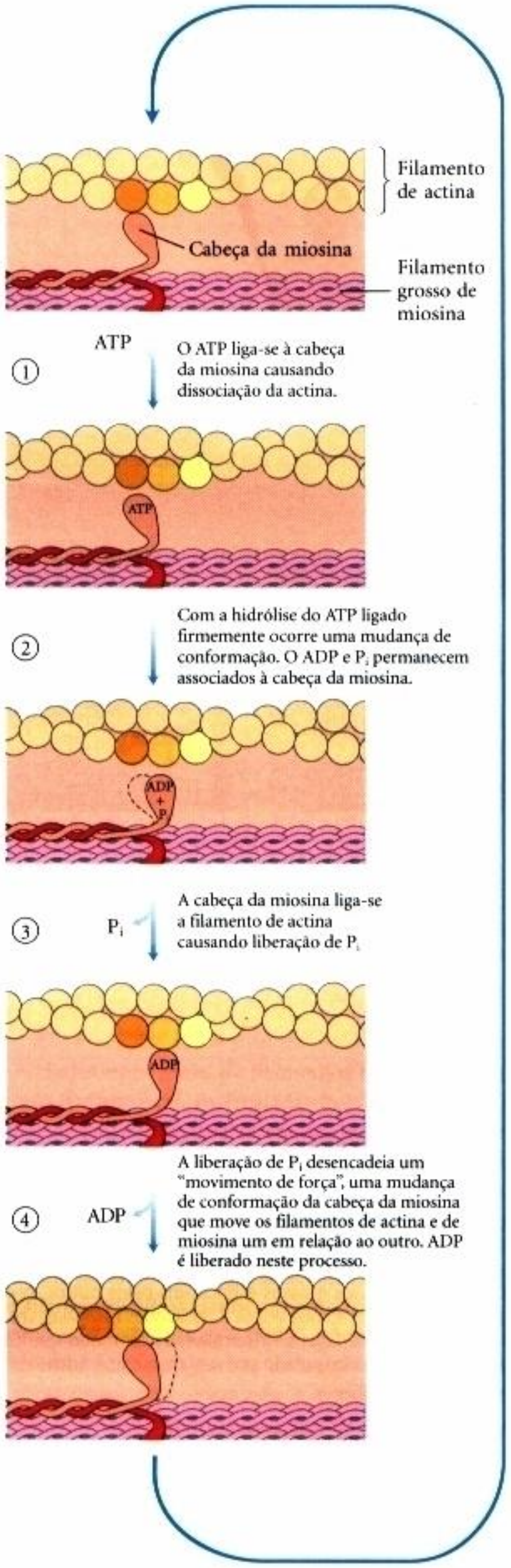
A interação entre a actina e a miosina, do mesmo modo que entre todas as proteínas e seus ligantes, envolve ligações fracas. Quando o ATP não está ligado à miosina, uma face da cabeça da miosina liga-se firmemente à actina (Fig. 7-33). Quando o ATP liga-se à miosina e é hidrolisado em ADP e fosfato, ocorre uma série de mudanças cíclicas e coordenadas na conformação, nas quais a miosina libera a subunidade de actina F e liga outra subunidade mais adiante ao filamento fino.

Esse ciclo tem quatro etapas principais (Fig. 7-33). ① O ATP liga-se à miosina, e abre-se uma fenda na molécula da miosina, perturbando a interação actina-miosina de modo a liberar a actina ligada. Então, o ATP é hidrolisado (etapa ②), causando uma mudança na conformação da proteína, levando a um estado de "energia alta", que move a cabeça da miosina e muda sua orientação em relação ao filamento fino da actina. A miosina liga-se então fracamente a uma subunidade de actina F mais próxima do disco Z do que a que acabou de ser liberada. Com a liberação do fosfato, produto da hidrólise do ATP da miosina na etapa ③, ocorre outra mudança na conformação, na qual a fenda da miosina se fecha tornando mais forte a ligação miosina-actina. Isso é rapidamente seguido pela etapa final, ④, um arranque durante o qual a conformação da cabeça da miosina retorna para a posição de repouso original, mudando sua orientação relativa à actina ligada ao tracionar a cauda da miosina em direção ao disco Z. O ADP é liberado, completando o ciclo. Cada ciclo gera 3 a 4pN (piconewtons) de força e move o filamento grosso 5 a 10nm em relação ao filamento fino.

Como há muitas cabeças de miosina em um filamento grosso, sempre algumas (provavelmente de 1% a 3%) estarão ligadas aos filamentos finos. Isso impede que o filamento grosso deslize de volta quando uma cabeça individual de miosina libera a subunidade de actina à qual ela estava presa. Dessa maneira, o filamento grosso desliza ativamente para a frente, para além dos filamentos finos adjacentes. Esse processo, com coordenação entre os muitos sarcômeros de uma fibra muscular, executa a contração do músculo.

A interação entre a actina e a miosina precisa ser regulada de modo que a contração só ocorra em resposta a sinais adequados vindos do sistema nervoso. A regulação é mediada por um complexo de duas proteínas, a **tropomiosina** e a **troponina**. A tropomiosina liga-se ao filamento fino bloqueando os sítios de ligação dos grupos-cabeça da miosina. A troponina é uma proteína ligadora de Ca^{2+}. Um impulso nervoso causa a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} liberado liga-se à troponina (outra proteína de ligação do ligante) e produz mudança na conformação dos complexos tropomiosina-troponina, expondo os sítios de ligação da miosina nos filamentos finos. Segue-se a contração.

O músculo esquelético em atividade requer dois tipos de funções moleculares que são comuns às proteínas — ligação e catálise. A interação actina-miosina, uma interação proteína-ligante semelhante à das imunoglobulinas com os antígenos, é reversível e não muda os participantes. Entretanto, quando o ATP se liga à miosina, ele é hidrolisado em ADP e P_i. A miosina não é somente uma proteína ligante de actina, mas também uma ATPase — uma enzima. A função das enzimas como catalisadoras das transformações químicas é tópico do próximo capítulo.



O ATP liga-se à cabeça da miosina causando dissociação da actina.

Com a hidrólise do ATP ligado firmemente ocorre uma mudança de conformação. O ADP e P_i permanecem associados à cabeça da miosina.

A cabeça da miosina liga-se a filamento de actina causando liberação de P_i

A liberação de P_i desencadeia um "movimento de força", uma mudança de conformação da cabeça da miosina que move os filamentos de actina e de miosina um em relação ao outro. ADP é liberado neste processo.

Figura 7-33 – Mecanismo molecular da contração muscular. As mudanças na conformação da cabeça da miosina, que estão acopladas às etapas do ciclo hidrolítico do ATP, levam a miosina, sucessivamente, a dissociar-se de uma subunidade de actina e, depois, associar-se à outra situada mais adiante no filamento fino de actina. Dessa maneira, as cabeças de miosina deslizam ao longo dos filamentos finos, tracionando o agrupamento de filamentos grossos para o agrupamento de filamentos finos (veja Fig. 7-32).

Resumo

As funções das proteínas envolvem, com freqüência, interações com outras moléculas. Uma molécula ligada a uma proteína é denominada ligante, e o sítio da proteína ao qual ela se liga é denominado sítio de ligação. As proteínas não são rígidas e podem passar por mudanças de conformação quando um ligante se liga a elas, processo denominado ajuste induzido. Em uma proteína com múltiplas subunidades, a ligação do ligante a uma subunidade pode afetar a ligação do ligante a outras subunidades. A ligação do ligante pode ser regulada. As proteínas ligadoras de oxigênio, as proteínas do sistema imunológico e as proteínas motoras constituem modelos úteis para ilustrar esses princípios.

A mioglobina e a hemoglobina contêm um grupo prostético denominado heme ao qual se liga o oxigênio. O heme consiste de um único átomo de Fe^{2+} coordenado dentro de uma porfirina. Algumas outras moléculas, tais como o CO e o NO, também podem ligar-se ao heme. A mioglobina é um único polipeptídeo com oito regiões α-helicoidais unidas por dobras. Ela tem uma única molécula de heme localizada em uma fenda situada profundamente no do polipeptídeo. O oxigênio liga-se reversivelmente à mioglobina. Uma ligação reversível simples pode ser descrita como uma constante de associação K_d. Para uma proteína monomérica, a fração de sítios de ligação ocupados por um ligante é uma função hiperbólica da concentração do ligante. Como o O_2 é um gás, o termo P_{50}, que descreve a pressão parcial do oxigênio na qual uma proteína ligadora de O_2 está meio saturada com o oxigênio ligado, é usado no lugar de K_d. A associação e a dissociação de O_2 dependem de pequenos movimentos moleculares da molécula da mioglobina, denominados "respiração".

A hemoglobina normal do adulto tem quatro subunidades que contêm heme, duas α e duas β. Elas têm estruturas semelhantes entre si e à da mioglobina. Interações fortes ocorrem entre subunidades diferentes (α e β). A hemoglobina existe em dois estados intercambiáveis, denominados T e R. O estado T é estabilizado por várias pontes salinas e é mais estável quando o oxigênio não está ligado. A ligação do oxigênio promove uma transição para o estado R.

A ligação do oxigênio à hemoglobina é alostérica e cooperativa. A ligação de O_2 a um sítio de ligação da hemoglobina afeta a ligação de O_2 a outros sítios semelhantes, um exemplo de comportamento de ligação alostérica. As mudanças de conformação entre os estados T e R, mediadas por interações subunidade-subunidade, dão origem a uma forma de alosterismo denominada ligação cooperativa. A ligação cooperativa resulta em uma curva de ligação sigmóide e pode ser analisada pelo "plot" de Hill. Dois grandes modelos foram propostos para explicar a ligação cooperativa de ligantes a proteínas com múltiplas subunidades. No modelo de concerto, todas as subunidades têm a mesma conformação em todos os momentos, e toda proteína passa por uma transição reversível entre duas conformações possíveis. A ligação sucessiva de uma molécula de ligante à conformação de baixa afinidade facilita o modelo seqüencial; subunidades individuais podem passar por mudanças de conformação. A ligação de um ligante a uma subunidade muda a conformação dessa subunidade facilitando mudanças semelhantes em outras subunidades e ligando ligantes adicionais a essas subunidades.

A hemoglobina também liga H^+ e CO_2. Em ambos os casos, a ligação resulta na formação de pares de íons, que estabilizam o estado T e enfraquecem a ligação de O_2, um fenômeno denominado efeito de Bohr. A ligação de H^+ e CO_2 à hemoglobina nos tecidos promove a liberação de O_2, e a ligação de O_2 à hemoglobina nos pulmões promove a liberação de H^+ e de CO_2. A ligação de O_2 à hemoglobina também é modulada por 2,3-bifosfoglicerato, que se liga ao estado T e o estabiliza.

A anemia falciforme é uma doença genética causada pela substituição de um único aminoácido (Glu por Val) na posição 6 das cadeias β da hemoglobina. Essa mudança produz uma zona hidrofóbica na superfície da proteína, o que leva as moléculas de hemoglobina a se agregarem em feixes de fibras. Esses feixes dão aos eritrócitos uma forma de foice. Essa condição homozigota resulta em complicações médicas graves.

A resposta imune é mediada por interações entre um conjunto de leucócitos especializados e suas proteínas associadas. Os linfócitos T produzem receptores de célula T. Os linfócitos B produzem imunoglobulinas. Todas as células expressam proteínas MHC, que apresentam peptídeos do hospedeiro (próprios) ou antigênicos (não-próprios) na superfície da célula. As células T "helper" induzem a proliferação daquelas células B e de células T citotóxicas produzindo imunoglobulinas ou receptores de células T que se ligam a um antígeno específico, um processo denominado seleção clonal.

Os seres humanos têm cinco classes de imunoglobulinas, cada uma das quais possui funções biológicas diferentes. A mais abundante é a IgG, uma proteína em forma de Y com duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Os domínios perto das extremidades superiores do Y são hipervariáveis na ampla população de IgGs e formam dois sítios de ligação de antígeno. Geralmente, uma dada imunoglobulina liga-se somente a uma parte, denominada epitopo, de um antígeno maior. A ligação envolve uma mudança de conformação da IgG, um ajuste induzido ao antígeno.

As interações proteína-ligante alcançam um grau especial de organização espacial e temporal nas proteínas motoras. A contração do músculo resulta de interações orquestradas entre a miosina e a actina, acopladas à hidrólise do ATP pela miosina. A miosina é constituída por duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves, formando um domínio fibroso em espiral (cauda) e um domínio globular (cabeça). As moléculas de miosina são organizadas em filamentos grossos, que deslizam pelos filamentos finos compostos em grande parte de actina. A hidrólise de ATP da miosina está acoplada a uma série de mudanças de conformação da cabeça da miosina, levando à dissociação da miosina de uma subunidade de actina F e à sua reassociação eventual com outra subunidade de actina F mais adiante nos filamentos de actina. Dessa maneira, a miosina desliza ao longo dos filamentos de actina. A contração do músculo é estimulada pela liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} liga-se à proteína troponina, levando a uma mudança de conformação do complexo troponina-tropomiosina, que desencadeia o ciclo de interações actina-miosina.

Leituras Adicionais

Proteínas ligantes de oxigênio

Ackers GK & Hazzard JH. (1993) Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 385-390.

Changeaux J-P. (1993) Allosteric proteins: from regulatory enzymes to receptors — personal recollections. *Bioassays* **15**, 625-634.

Uma perspectiva interessante de um líder no campo.

Dickerson RE & Geis I. (1982) *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.

di Prisco G, Condò SG, Tamburrini M, & Giardina B. (1991) Oxygen transport in extreme environments. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 471-474.

Uma comparação reveladora das propriedades ligantes de oxigênio das hemoglobinas de espécies polares.

Koshland DE Jr, Nemethy G, & Filmer D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **6**, 365-385.

Artigo no qual foi introduzido o modelo seqüencial.

Monod J, Wyman J, & Changeux JP. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.

Nesse artigo fundamental, o modelo de concerto foi proposto pela primeira vez.

Olson JS & Phillips GN Jr. (1996) Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin. *J. Biol. Chem.* **271**, 17.593-17.596.

Perutz MF. (1989) Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 42-44.

Perutz MF, Wilkinson AJ, Paoli M, & Dodson GG. (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1-34.

Proteínas do sistema imunológico

Blom B, Res PC, & Spits H. (1998) T cell precursors in man and mice. *Crit. Rev. Immunol.* **18**, 371-388.

Cohen IR. (1988) The self, the world and autoimmunity. *Sci Am.* **258**, (April), 52-60.

Davies DR & Chacko S. (1993) Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* **26**, 421-427.

Davies DR, Padlan EA, & Sheriff S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439-473.

Davis MM. (1990). T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 475-496.

Dutton RW, Bradley LM, & Swain SL. (1998) T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 201-223.

Life, Death and the Immune System. (1993) *Sci. Am.* **269** (September).

Um número especial sobre o sistema imunológico.

Marrack P & Kappler J. (1987) The T cell receptor. *Science* **238**, 1073-1079.

Müller-Eberhard HJ. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 321-337.

Parham P & Ohta T. (1996) Population biology of antigen presentation by MHC class I moleculares. *Science* **272**, 67-74.

Ploegh, HL. (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248-253.

Thomsen AR, Nansen A, & Christensen JP. (1998) Virus-induced T cell activation and the inflammatory response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **231**, 99-123.

Van Parjis L & Abbas AK. (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lynmphocytes off. *Science* **280**, 243-248.

York IA & Rock KL. (1996) Antigen processing and presentation by the class-I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 369-396.

Motores moleculares

Finer JT, Simmons RM & Spudich JA. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**, 113-119.

Técnicas modernas revelam as forças que influenciam as proteínas motoras individuais.

Geeves, MA & Holmes KC. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728.

Goldman YE. (1998) Wag the tail: structural dynamics of actomyosin. *Cell* **93**, 1-4.

Huxley HE. (1998) Getting to grips with contraction: the interplay of structure and biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 84-87.

Uma interessante perspectiva histórica sobre como foi decifrado o mecanismo da contração muscular.

Labeit S & Kolmerer B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293-296.

Uma descrição estrutural e funcional de algumas das maiores proteínas conhecidas.

Rayment I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15.850-15.853.

Um exame do mecanismo sob uma perspectiva estrutural.

Rayment I & Holden HM. (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 129-134.

Spudich JA. (1994) How molecular motors work. *Nature* **372**, 515-518.

Problemas

1. Relação entre afinidade e constante de dissociação. A proteína A tem um sítio de ligação para o ligante X com uma K_d de 10^{-6}M. A proteína B tem um sítio de ligação para o ligante X com uma K_d de 10^{-9}M. Qual proteína tem uma afinidade maior com o ligante X? Explique seu raciocínio. Converta o K_d para K_a, para ambas as proteínas.

2. Cooperatividade negativa. Qual das seguintes situações produziria um "plot" de Hill com $n_H < 1,0$? Explique seu raciocínio em cada caso:

(a) A proteína tem múltiplas subunidades, cada uma com um único sítio de ligação-ligante. A ligação do ligante a um sítio diminui a afinidade de outros sítios para o ligante.

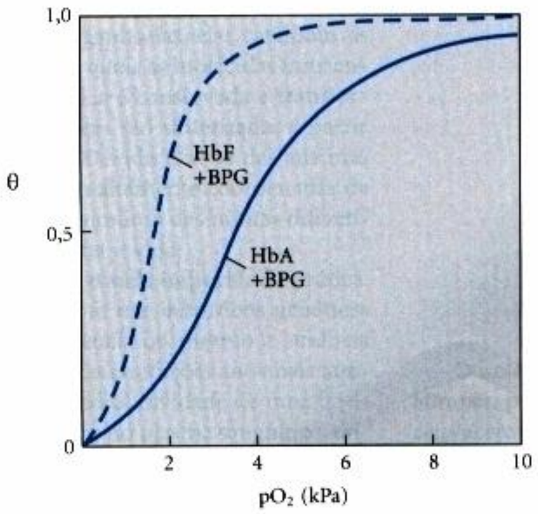
(b) A proteína é um polipeptídeo único com dois sítios de ligação-ligante, cada um tendo uma afinidade diferente para o ligante.

(c) A proteína é um polipeptídeo único com um único sítio de ligação-ligante. Na purificação, a preparação da proteína mostra-se heterogênea, contendo algumas moléculas de proteínas que estão parcialmente desnaturadas e, portanto, têm uma menor afinidade de ligação para o ligante.

3. Afinidade da mioglobina e da hemoglobina com o oxigênio. Qual é o efeito das seguintes mudanças da afinidade do O_2 com a mioglobina e a hemoglobina? (a) Uma queda do pH do plasma do sangue de 7,4 para 7,2. (b) Uma diminuição da pressão parcial de CO_2 nos pulmões de 6kPa (prendendo a respiração) para 2kPa (normal). (c) Um aumento do nível de BPG de 5mM (altitudes normais) para 8mM (altitudes elevadas).

4. Cooperatividade da hemoglobina. Em condições apropriadas, a hemoglobina dissocia-se em sua forma de quatro subunidades. A subunidade α isolada liga oxigênio, mas a curva de saturação de O_2 é hiperbólica, e não sigmóide. Além disso, a ligação do oxigênio a uma subunidade α isolada não é afetada pela presença de H^+, CO_2 ou BPG. O que essas observações indicam sobre a fonte da cooperatividade na hemoglobina?

5. Comparação da hemoglobina fetal com a materna. Estudos do transporte de oxigênio na gravidez de mamíferos mostraram que as curvas de saturação de O_2 do sangue fetal e do materno são acentuadamente diferentes, quando medidas sob as mesmas condições. Os eritrócitos fetais contêm uma variante estrutural da hemoglobina, HbF, constituída por duas subunidades α e duas γ ($\alpha_2\gamma_2$), enquanto os eritrócitos maternos contêm HbA ($\alpha_2\beta_2$).



(a) Em condições fisiológicas, qual hemoglobina tem uma afinidade maior com o oxigênio. HbA ou HbF? Explique.

(b) Qual é o significado fisiológico das diferentes afinidades com O_2?

(c) Quando todo o BPG é cuidadosamente removido de amostras de HbA e HbF, as curvas de saturação de O_2 medidas (e, conseqüentemente, as afinidades por O_2) estão deslocadas para a esquerda. Entretanto, agora a HbA tem uma maior afinidade com o oxigênio do que a HbF. Quando o BPG é reintroduzido, as curvas de saturação de O_2 voltam ao normal, como mostrado no gráfico. Qual é o efeito do BPG sobre a afinidade da hemoglobina com O_2? Como é possível usar essa informação para explicar as diferentes afinidades de O_2 da hemoglobina fetal e materna?

6. Variantes da hemoglobina. Há quase 500 variantes da hemoglobina, que ocorrem naturalmente. A maioria resulta da substituição de um único aminoácido em uma cadeia polipeptídica da globina. Algumas variantes produzem doença clínica, apesar de nem todas as variantes terem efeitos deletérios. A seguir é apresentada uma pequena amostra:

HbS (Hb falciforme): substituição de uma Val por uma Glu na superfície.
Hb Cowtown: elimina um par de íons envolvidos na estabilização do estado T.
Hb Memphis: substituição de um resíduo polar sem carga por outro de tamanho semelhante na superfície.
Hb Bibba: substituição de uma Pro por uma Leu envolvida em uma α-hélice.
Hb Milwaukee: substituição de uma Glu por uma Val.
Hb Providence: substituição de uma Asn por uma Lys que, normalmente, se projeta para dentro da cavidade central do tetrâmero.
Hb Philly: substituição de uma Phe por uma Tyr, rompendo pontes de hidrogênio na interface $\alpha_1\beta_1$.

Explique suas escolhas para cada item a seguir:

(a) A variante de Hb com *menor* probabilidade de causar sintomas patológicos.

(b) A(s) variante(s) com maior probabilidade de mostrar valores de pI diferentes dos da HbA quando corridos em um gel de isoeletrofocalização.

(c) A(s) variante(s) com maior probabilidade de mostrar uma diminuição da ligação de BPG e um aumento da afinidade geral da hemoglobina com o oxigênio.

7. Ligação reversível (mas firme) a um anticorpo. Um anticorpo liga-se a um antígeno com uma K_d de 5×10^{-8}M. Em qual concentração de antígeno θ será (a) 0,2, (b) 0,5, (c) 0,6, (d) 0,8?

8. Usando anticorpos para testar (probe) as relações estrutura-função das proteínas. Um anticorpo monoclonal liga-se à actina G, mas não à actina F. O que isso lhe diz a respeito do epitopo reconhecido pelo anticorpo?

9. O sistema imunológico e as vacinas. Um organismo hospedeiro necessita de tempo, freqüentemente dias, para montar uma resposta imune contra um antígeno novo, mas as células de memória possibilitam uma resposta rápida contra patógenos encontrados previamente. Uma vacina para proteger contra uma determinada infecção viral consiste, com freqüência, de um vírus enfraquecido ou morto, ou de proteínas isoladas da capa protéica do vírus. Quando injetada em um ser humano, geralmente a vacina não causa infecção ou doença, mas ela "ensina", de modo efetivo, ao sistema imunológico que as partículas virais são semelhantes, estimulando a produção de células de memória. Em uma infecção subseqüente, essas células podem ligar-se ao vírus e desencadear uma resposta imunológica rápida. Alguns patógenos, incluindo o HIV, desenvolveram mecanismo para escapar do sistema imunológico, tornando difícil, se não impossível, desenvolver vacinas efetivas contra eles. Que estratégia um patógeno poderia usar para escapar do sistema imunológico? Presuma que os anticorpos e/ou receptores de células T estejam disponíveis para ligar-se a qualquer estrutura que possa aparecer na superfície de um patógeno e que, tendo se ligado, o patógeno é destruído.

10. Como nos tornamos "rígidos". Quando um vertebrado superior morre, seus músculos enrijecem ao ficar desprovidos de ATP, um estado denominado *rigor mortis*. Explique a base molecular do estado de *rigor mortis*.

11. Sarcômeros sob um outro ponto de vista. A simetria dos filamentos grossos e finos de um sarcômero é tal que, geralmente, seis filamentos finos circundam cada filamento grosso em uma disposição hexagonal. Desenhe um corte transversal de uma miofibrila nos seguintes pontos: (a) na linha M; (b) através da banda I; (c) através da região densa da banda A; (d) através da região menos densa da banda A, adjacente à linha M (veja Fig. 7-31b).

Bioquímica na internet

12. Lisozima e anticorpos. A fim de ter uma compreensão completa de como as proteínas funcionam em uma célula, é útil ter uma visão tridimensional de como as proteínas interagem com outros componentes celulares. Felizmente, é possível usar a internet e bases de dados (databases) de proteínas on line. Procure no site da bioquímica em http://www.worthpublishers.com/lehninger para saber como usar a "utility viewing" tridimensional Chemscape Chime. Você, então, deve usar o Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank) e o Chemscape Chime para estudar as interações entre anticorpos e antígenos de modo mais detalhado.
Para examinar as interações entre a enzima lisozima (Capítulo 6) e a porção Fab do anticorpo antilisozima consulte Protein Data Bank Website. Use o identificador PDB 1FDL para obter a página de dados do Complexo Fragmento Fab IgG1–Lisozima (complexo anticorpo-antígeno). Abra a estrutura usando o Chemscape Chime e use as diferentes opções de observação para responder às seguintes questões:

(a) Quais cadeias do modelo tridimensional correspondem ao fragmento anticorpo e quais correspondem ao antígeno, lisozima?

(b) Qual estrutura secundária predomina nesse fragmento Fab?

(c) Como estão os muitos resíduos de aminoácidos nas cadeias pesada e leve do fragmento Fab e na lisozima? Faça uma estimativa da porcentagem de lisozima que interage com o sítio de ligação do antígeno do fragmento anticorpo.

(d) Identifique os resíduos de aminoácidos específicos da lisozima e das regiões variáveis das cadeias pesada e leve que parecem estar situados na interface antígeno-anticorpo. Os resíduos são contíguos na seqüência primária da cadeia polipeptídica?

CAPÍTULO 8

Enzimas

Existem duas condições fundamentais para a vida. Uma delas é que o organismo vivo deve ser capaz de se auto-replicar (tópico que será visto na Parte IV deste livro). A segunda é que o organismo deve ser capaz de catalisar reações químicas eficiente e seletivamente. A importância fundamental da catálise pode surpreender alguns estudantes iniciantes em bioquímica, mas é fácil ilustrá-la. Como descrito no Capítulo 1, os sistemas vivos utilizam energia do meio ambiente. Os seres humanos, por exemplo, consomem quantidades substanciais de sacarose — o açúcar comumente usado — como uma espécie de combustível, na forma de alimentos açucarados, bebidas, ou como açúcar. A conversão da sacarose em CO_2 e H_2O na presença de oxigênio é um processo altamente exergônico, que libera energia livre que pode ser utilizada para o ato de pensar, mover, sentir e ver. Entretanto, um saco de açúcar pode ser armazenado durante vários anos sem ser transformado em CO_2 e H_2O. Embora esse processo químico seja termodinamicamente favorável, ele é muito lento! Contudo, quando a sacarose é consumida por uma pessoa (ou qualquer outro organismo), ela libera sua energia química em segundos. A diferença é a catálise. Sem a catálise, as reações químicas necessárias para sustentar a vida não ocorrem em uma escala de tempo útil.

Voltaremos, agora, nossa atenção para os catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos: as enzimas, as mais notáveis e altamente especializadas proteínas. As enzimas apresentam uma eficiência catalítica extraordinária, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas de uma maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não-biológicos apresentam tais propriedades.

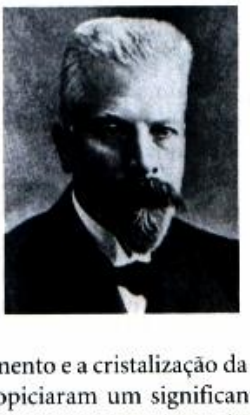
As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Agindo em seqüências organizadas, elas catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas, a energia química é conservada e transformada e as macromoléculas biológicas são sintetizadas a partir de moléculas precursoras simples. Devido à ação das enzimas reguladoras, as vias metabólicas são altamente coordenadas de forma a produzir uma atuação harmoniosa das muitas diferentes atividades necessárias para manter a vida.

O estudo das enzimas tem uma grande importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer uma deficiência ou mesmo a ausência total de uma ou mais enzimas. Outras condições anormais também podem ser causadas pela excessiva atividade de uma enzima. Medidas da atividade de enzimas no plasma sangüíneo, eritrócitos ou amostras de tecido são importantes no diagnóstico de várias doenças. Muitas drogas exercem seu efeito biológico por meio de interações com as enzimas. As enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas não apenas na medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e na agricultura.

Iniciaremos este capítulo com a descrição das propriedades das enzimas e dos princípios fundamentais de seu poder catalítico. Em seguida, faremos uma introdução à cinética enzimática, uma disciplina que fornece a maior parte dos fundamentos para qualquer discussão sobre enzimas. Exemplos específicos de mecanismos enzimáticos serão então mostrados, ilustrando os princípios introduzidos anteriormente. Finalmente, discutiremos as enzimas reguladoras.

Uma Introdução às Enzimas

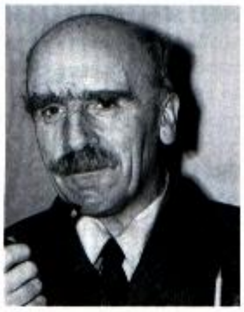
A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final de 1700, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago. Em 1800 as pesquisas continuaram com o estudo da conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Em 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por "fermentos". Ele postulou que esses fermentos eram inseparáveis da estrutura das células vivas de levedura, uma hipótese chamada vitalismo, que prevaleceu por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedura podiam fermentar o açúcar até álcool, provando que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam funcionando mesmo quando removidas das células. Frederick W. Kühne denominou tais moléculas de **enzimas**. À medida que as noções do vitalismo da vida foram refutadas, o isolamento de novas enzimas e a investigação das suas propriedades propiciaram o progresso da ciência da bioquímica.



Eduard Buchner (1860-1917)

O isolamento e a cristalização da urease, em 1926, por James Sumner, propiciaram um significante avanço nos estudos iniciais acerca das enzimas. Sumner demonstrou que os cristais de urease consistiam inteiramente de proteína e postulou que todas as enzimas são proteínas. Devido à falta de outros exemplos, essa premissa permaneceu controvertida por algum tempo. So-

James Sumner
(1887-1955)



J.B.S. Haldane
(1892-1964)

mente em 1930, após John Northrop e Moses Kunitz terem cristalizado a pepsina, a tripsina e outras enzimas digestivas e concluído que elas também eram proteínas, é que a conclusão de Sumner foi completamente aceita. Durante esse período, J.B.S. Haldane escreveu um tratado intitulado "Enzimas". Embora a natureza molecular das enzimas não estivesse completamente elucidada, Haldane fez a extraordinária sugestão de que as interações fracas que se estabelecem entre a enzima e o seu substrato poderiam ser usadas para distorcer a molécula do substrato e catalisar a reação. Esse conhecimento representa o cerne da compreensão atual da catálise enzimática.

No final do século XX, a pesquisa com enzimas que catalisam as reações do metabolismo celular foi intensa. Esse fato levou à purificação de milhares de enzimas, à elucidação da estrutura molecular e do mecanismo químico da ação de centenas delas e a uma compreensão geral de como as enzimas funcionam.

A maioria das enzimas são proteínas

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas (Capítulo 26), todas as enzimas são proteínas. A sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protéica nativa. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades, a atividade catalítica geralmente é destruída. Se uma enzima é quebrada em seus aminoácidos constituintes, a sua atividade catalítica é sempre destruída. Assim, as estruturas protéicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a sua atividade catalítica.

As enzimas, como outras proteínas, têm pesos moleculares que variam de cerca de 12.000 até mais de 1 milhão. Algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico, além de seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem um componente químico adicional chamado de **co-fator** — um ou mais íons inorgânicos, tal como Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} ou Zn^{2+} (Tabela 8-1), uma molécula orgânica complexa ou uma molécula metalorgânica chamada de **coenzima** (Tabela 8-2). Algumas enzimas requerem *ambas*, a coenzima e um ou mais íons metálicos para a sua atividade. A coenzima, ou íon metálico, que está firmemente ou até mesmo covalentemente ligada à parte protéica da enzima é chamada de **grupo prostético**. Uma enzima completa e cataliticamente ativa, juntamente com sua coenzima e/ou íons metálicos ligados, é chamada de **holoenzima**. A parte protéica dessa enzima é chamada de **apoenzima** ou **apoproteína**. As coenzimas funcionam como transportadores transitórios de grupos funcionais específicos (Tabela 8-2). Geralmente elas são derivadas de vitaminas, nutrientes orgânicos necessários em pequenas quantidades na alimentação diária. As coenzimas serão estudadas com maiores detalhes à medida que aparecerem nas vias metabólicas discutidas na Parte III deste livro.

Tabela 8-1 – Alguns elementos inorgânicos que servem como co-fatores das enzimas

Cu^{2+}	Citocromo oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo oxidase, catalase, peroxidase
K^+	Piruvato quinase
Mg^{2+}	Hexoquinase, glicose-6-fosfatase, piruvato quinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutationa peroxidase
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, desidrogenase alcoólica, carboxipeptidases A e B

Tabela 8-2 – Algumas coenzimas que servem como carregadores transientes de átomos específicos ou grupos funcionais*

Coenzima	Exemplos de grupos químicos transferidos	Precursor dietético em mamíferos
Biocitina	CO_2	Biotina
Coenzima A	Grupos acila	Ácido pantotênico e outros compostos
5'-deoxiadenosil-cobalamina (coenzima B_{12})	Átomos de H e grupos acila	Vitamina B_{12}
Flavina adenina dinucleotídeo	Elétrons	Riboflavina (vitamina B_2)
Lipoato	Elétrons e grupos acila	Não requerido na dieta
Nicotinamida adenina dinucleotídeo	Íon hidreto (:H^-)	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal fosfato	Grupos amina	Piridoxina (vitamina B_6)
Tetraidrofolato	Grupos monocarbônicos	Folato
Tiamina pirofosfato	Aldeídos	Tiamina (vitamina B_1)

*A estrutura e o modo de ação dessas coenzimas estão descritos na Parte III deste livro.

Finalmente, algumas enzimas são modificadas covalentemente por fosforilação, glicosilação e outros processos. Muitas dessas alterações estão envolvidas na regulação da atividade enzimática.

As enzimas são classificadas pelas reações que catalisam

Muitas enzimas têm sido nomeadas pela adição do sufixo "- ase" ao nome de seu substrato, ou à palavra ou frase que descreve sua atividade. Assim, a urease catalisa a hidrólise da uréia, e a DNA polimerase catalisa a polimerização dos nucleotídeos para formar o DNA. Outras enzimas, como a pepsina e a tripsina, têm nomes independentes dos seus substratos ou reações. Algumas vezes, a mesma enzima tem dois ou mais nomes, ou duas diferentes enzimas possuem o mesmo nome. Devido a tais ambigüidades e ao sempre crescente número de enzimas recém-descritas, por intermédio de um acordo internacional, foi adotado um sistema para nomear e classificar as enzimas. Esse sistema divide as enzimas em seis grandes classes, cada uma com subclasses, conforme o tipo de reação catalisada (Tabela 8-3). A cada enzima é atribuído um número classificatório de quatro dígitos e um nome sistemático, que identifica a reação que ela catalisa. Exemplificando, o nome sistemático formal da enzima que catalisa a reação:

$$\text{ATP} + \text{D-glicose} \longrightarrow \text{ADP} + \text{D-glicose-6-fosfato}$$

é ATP-glicose fosfotransferase, indicando que ela catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para a glicose. O seu nú-

Tabela 8-3 – Classificação internacional das enzimas*

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidorredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C—C, C—S, C—O e C—N por meio de reações de condensação acopladas à quebra do ATP

*A maioria das enzimas catalisa a transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais. Desse modo, elas são classificadas de acordo com um número de código e atribuindo-se um nome de acordo com o tipo da reação de transferência, do grupo doador e do grupo aceptor.

mero na Comissão de Enzimas (número E.C.) é 2.7.1.1. O primeiro dígito (2) denota o nome da classe (transferase); o segundo dígito (7), a subclasse (fosfotransferase); o terceiro dígito (1), uma fosfotransferase que apresenta um grupo hidroxila aceptor de fosfato; e o quarto dígito (1) indica que a D-glicose é o aceptor do grupo fosfato. Para muitas enzimas, um nome trivial pode ser usado, como por exemplo no caso da hexoquinase.

Uma lista completa e a descrição das milhares de enzimas conhecidas está além do objetivo deste livro. Este capítulo é destinado principalmente aos princípios e às propriedades comuns a todas as enzimas.

Como as Enzimas Funcionam

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas — muitas das moléculas biológicas são bastante estáveis no ambiente aquoso, de pH neutro e temperatura moderada, do interior das células. Além disso, muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são desfavoráveis ou improváveis no ambiente celular, tais como a formação de intermediários carregados ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa necessária para que ocorra a reação. Sem catálise, as reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem com uma velocidade útil.

Uma enzima contorna esses problemas fornecendo um ambiente específico onde uma dada reação é energeticamente mais favorável. A característica que distingue uma reação catalisada enzimaticamente é a de ela ocorrer no interior dos limites de uma cavidade na enzima chamada **sítio ativo** (Fig. 8-1). A molécula que se liga ao sítio ativo e sofre a ação da enzima é chamada **substrato**. A superfície do centro ativo é contornada com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes se ligam ao substrato e catalisam a sua transformação. O complexo enzima-substrato, cuja existência foi inicialmente proposta por Adolphe Wurtz em 1880, é fundamental para a ação das enzimas. Ele é também o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas, bem como para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos.

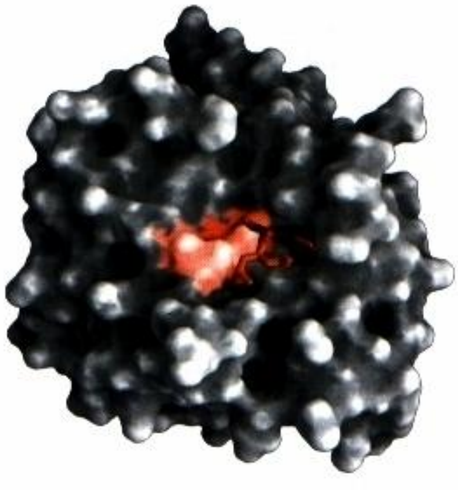


Figura 8-1 – Ligação de uma molécula de substrato no sítio ativo de uma enzima. A enzima quimotripsina está ligada ao substrato mostrado em vermelho. Alguns aminoácidos essenciais do sítio ativo são mostrados como manchas vermelhas na superfície da enzima.

As enzimas afetam a velocidade mas não o equilíbrio químico das reações

Uma reação enzimática simples pode ser escrita

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P \qquad (8\text{-}1)$$

onde E, S e P representam, a enzima, o substrato e o produto, respectivamente. ES e EP são complexos transientes da enzima com o substrato e o produto.

Para compreender a catálise enzimática, precisamos entender primeiro a importante distinção entre equilíbrio da reação (discutido no Capítulo 4) e velocidade da reação. A função de um catalisador é aumentar a *velocidade* de uma reação. Os catalisadores não afetam o *equilíbrio* da reação. Qualquer reação do tipo $S \rightleftharpoons P$ pode ser descrita por um diagrama de coordenadas da reação (Fig. 8-2), uma representação das mudanças de energia durante a reação. Conforme explicado nos Capítulos 1 e 3, a energia nos sistemas biológicos é descrita em termos de energia livre, *G*. No diagrama de coordenadas, a energia livre do sistema é representada em função do progresso da reação (coordenada da reação). O ponto de partida, tanto para a reação de ida como para a reação reversa, é chamado **estado fundamental** e representa a contribuição de uma molécula típica (S ou P) para a energia livre do sistema, em um dado conjunto de condições. Para

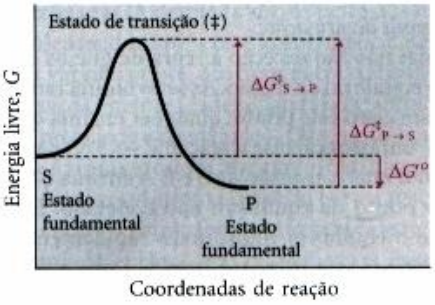


Figura 8-2 – Diagrama de coordenadas de reação para uma reação química. A energia livre do sistema é representada em função do progresso da reação $S \rightleftharpoons P$. Um diagrama desta natureza descreve as mudanças de energia durante a reação, e o eixo horizontal (coordenadas da reação) reflete as mudanças químicas sucessivas (por exemplo, quebra e formação de ligações) à medida que S é convertido em P. As energias de ativação para as reações $S \rightarrow P$ e $P \rightarrow S$ estão indicadas por $\Delta G^{\ddagger}$. $\Delta G'^{\circ}$ é a variação total da energia livre padrão para a reação $S \rightarrow P$.

descrever as variações de energia livre das reações, os químicos definem um conjunto de condições-padrão (temperatura 298K; pressão parcial de cada gás 1 atm ou 101,3kPa; concentração de cada soluto 1M) e expressam a variação da energia livre para esse sistema reagente como ΔG^o, **a variação da energia livre padrão.** Como os sistemas biológicos geralmente envolvem concentrações de H^+ muito diferentes de 1M, os bioquímicos definem a **variação da energia livre padrão bioquímica**, $\Delta G'^o$, como sendo a variação da energia livre padrão em *pH 7,0*, que será utilizada neste livro. Uma definição mais completa de $\Delta G'^o$ é dada no Capítulo 14.

O equilíbrio entre S e P reflete a diferença em energia livre dos seus estados fundamentais. No exemplo mostrado na Figura 8-2, a energia livre do estado fundamental de P é menor que a de S, assim $\Delta G'^o$ é negativo para a reação S → P e o equilíbrio favorece a formação de P. A posição e a direção do equilíbrio *não* são afetadas por nenhum catalisador.

Um equilíbrio favorável *não* significa que a conversão S → P ocorra com uma velocidade mensurável. A velocidade da reação depende de um parâmetro completamente diferente. Existe uma barreira energética entre S e P que representa a energia necessária para o alinhamento dos grupos químicos reagentes, formação de cargas transientes instáveis, rearranjos de ligações e outras transformações necessárias para que a reação ocorra em uma das direções. Isso é ilustrado pela "colina" de energia nas Figuras 8-2 e 8-3. Para sofrer a reação, as moléculas devem superar essa barreira e, portanto, precisam ser excitadas até um nível de energia maior. No topo da colina de energia está um ponto no qual a passagem para o estado de S ou P é igualmente provável (é sempre um caminho "morro abaixo" em cada sentido). Esse é o chamado **estado de transição.** O estado de transição não é uma espécie química que apresenta uma estabilidade significativa e não deve ser confundido com um intermediário da reação (tal como ES ou EP). Ele é apenas um momento molecular efêmero no qual eventos como quebra de ligações, formação de ligações e desenvolvimento de cargas ocorrem em um ponto preciso no qual a decomposição para formar o substrato ou o produto é igualmente provável. A diferença entre os níveis de energia do estado fundamental e do estado de transição é chamada **energia de ativação** ($\Delta G^\ddagger$). A velocidade de uma reação reflete essa energia de ativação, isto é, uma energia de ativação alta corresponde a uma reação lenta. As velocidades das reações podem ser aumentadas pela elevação da temperatura, que aumenta o número de moléculas com energia suficiente para superar essa barreira de energia. Alternativamente, a energia de ativação pode ser diminuída pela adição de um catalisador (Fig. 8-3). *Os catalisadores aumentam a velocidade das reações diminuindo a energia de ativação.*

As enzimas não são exceção à regra de que os catalisadores não afetam o equilíbrio da reação. As setas bidirecionais na Equação 8-1 deixam claro este ponto: qualquer enzima que catalisa a reação S → P também catalisa a reação P → S. O papel das enzimas é *acelerar* a interconversão de S e P. A enzima não é gasta no processo e o ponto de equilíbrio não é afetado. Entretanto, a reação atinge o equilíbrio muito mais rapidamente quando a enzima apropriada está presente, uma vez que a velocidade da reação é aumentada.

Esse princípio geral pode ser ilustrado considerando-se a conversão da sacarose e oxigênio em CO_2 e H_2O:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightleftharpoons 12CO_2 + 11H_2O$$

Esta conversão, que ocorre por meio de uma série de reações isoladas, tem um $\Delta G'^o$ elevado e negativo, e, no equilíbrio, a quantidade de sacarose é desprezível. A sacarose é um composto estável porque a barreira de energia de ativação que deve ser superada para que ela reaja com o oxigênio é muito grande. Ela pode ser armazenada em um recipiente contendo O_2 indefinidamente, sem reagir. Entretanto, nas células, a sacarose é rapidamente transformada em CO_2 e H_2O por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas. Essas enzimas não apenas aceleram as reações, mas as organizam e as controlam de tal forma que a maior parte da energia liberada é conservada em outras formas químicas, ficando assim disponível para a célula executar outras tarefas. O caminho reacional pelo qual a sacarose (e outros açúcares) é degradada é a via primária de liberação de energia (Capítulos 15 e 19), e as enzimas dessa via permitem que a seqüência de reações ocorra em uma escala de tempo biologicamente útil.

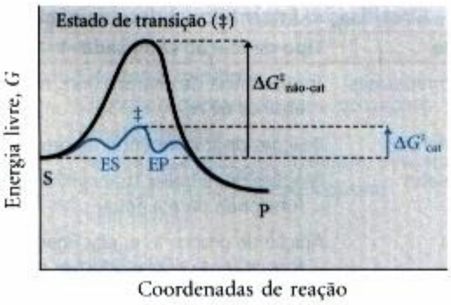


Figura 8-3 – Diagrama de coordenadas de reação comparando uma reação catalisada enzimaticamente com uma não-catalisada. Na reação S → P, os intermediários ES e EP assumem valores mínimos na curva de progresso da reação catalisada enzimaticamente. Os termos $\Delta G^\ddagger_{\text{não-cat}}$ e $\Delta G^\ddagger_{\text{cat}}$ correspondem às energias de ativação das reações não-catalisada e catalisada, respectivamente. A energia de ativação para o processo global é menor quando a enzima catalisa a reação.

Na prática, qualquer reação pode ter vários passos (etapas) envolvendo a formação e o consumo de espécies químicas transientes, chamados de **intermediários da reação***. Quando a reação S ⇌ P é catalisada por uma enzima, os complexos ES e EP são os intermediários (Eq. 8-1). Eles ocupam os vales no diagrama de coordenadas da reação (Fig. 8-3). Quando ocorrem vários passos em uma reação, a velocidade total é determinada pelo passo (ou passos) com a maior energia de ativação. Esse passo é chamado "**passo limitante da velocidade**". Para os casos simples, o passo limitante da velocidade é o ponto de mais alta energia no diagrama para as interconversões de S e P. Na prática, o passo limitante da velocidade pode variar com as condições da reação. Para muitas enzimas, vários passos têm energia de ativação similar, o que significa que todos eles são parcialmente limitantes da velocidade.

Como descrito no Capítulo 1, as energias de ativação são barreiras energéticas para as reações químicas. Essas barreiras são cruciais para a existência da própria vida. A estabilidade de uma molécula aumenta com o aumento da altura de sua barreira de ativação. Sem tais barreiras energéticas, as macromoléculas complexas poderiam reverter espontaneamente para as formas moleculares mais simples, e as estruturas complexas e altamente ordenadas, bem como os processos metabólicos das células, poderiam não existir. As enzimas evoluíram para diminuir *seletivamente* as energias de ativação de reações necessárias à sobrevivência das células.

---

* Observe que os termos "passos" e "intermediários" neste capítulo se referem às espécies químicas que ocorrem no caminho reacional de uma simples reação catalisada enzimaticamente. No contexto das vias metabólicas que envolvem várias enzimas (Parte III deste livro), esses termos são usados de uma maneira diferente. Uma reação enzimática geralmente é considerada como um "passo" em uma via metabólica, e o produto de uma reação enzimática (que é o substrato para a próxima enzima na via) é considerado como um "intermediário".

A velocidade e o equilíbrio das reações têm definições termodinamicamente precisas

O *equilíbrio* de uma reação está intrinsecamente ligado ao $\Delta G'^{\circ}$, enquanto a *velocidade* da reação está ligada ao $\Delta G^{\ddagger}$. Uma introdução básica a essas relações termodinâmicas é o próximo passo na compreensão de como as enzimas trabalham.

Um equilíbrio como $S \rightleftharpoons P$ é descrito por uma **constante de equilíbrio**, K_{eq} ou simplesmente K (Capítulo 4). Sob condições-padrão, empregadas para comparar processos bioquímicos, uma constante de equilíbrio é expressa por K'_{eq} (ou K'):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \qquad (8\text{-}2)$$

Da termodinâmica, a relação entre K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$ pode ser descrita pela expressão:

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq} \qquad (8\text{-}3)$$

onde R é a constante dos gases, 8,315J/mol · K, e T é a temperatura absoluta, 298K (25°C). A Equação 8-3 será desenvolvida e discutida com maiores detalhes no Capítulo 14. O ponto importante aqui é que a constante de equilíbrio está diretamente relacionada com a variação global da energia livre padrão da reação (Tabela 8-4). Um grande valor negativo para $\Delta G'^{\circ}$ reflete um equilíbrio de reação favorável mas, como já foi salientado, isso não significa que a reação ocorrerá com uma velocidade considerável.

Tabela 8-4 – A relação entre K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$ (veja Eq. 8-3)

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0,0
10^{1}	−5,7
10^{2}	−11,4
10^{3}	−17,1

A velocidade de qualquer reação é determinada pela concentração do reagente (ou dos reagentes) e pela **constante de velocidade**, geralmente representada pelo símbolo k. Para a reação unimolecular $S \rightarrow P$, a velocidade da reação V, que representa a quantidade de S que reage por unidade de tempo, é expressa pela **equação da velocidade**:

$$V = k[S] \qquad (8\text{-}4)$$

Nesta reação, a velocidade depende apenas da concentração de S. Ela é chamada de reação de primeira ordem. O fator k é uma constante de proporcionalidade que reflete a probabilidade de a reação ocorrer em um dado conjunto de condições (pH, temperatura etc.). Aqui, k é uma constante de velocidade de primeira ordem e sua unidade é o recíproco do tempo, por exemplo s^{-1}. Se uma reação de primeira ordem tem uma constante k de velocidade de $0{,}03s^{-1}$, isso pode ser interpretado (qualitativamente) que 3% do S disponível será convertido a P em 1s. Uma reação com uma constante de velocidade de $2.000s^{-1}$ estará terminada em uma pequena fração de segundo. Se a velocidade da reação depende da concentração de dois compostos diferentes, ou se duas moléculas do mesmo composto reagem entre si, a reação é de segunda ordem e k é uma constante de velocidade de segunda ordem, com unidade $M^{-1}s^{-1}$. Nesse caso, a equação da velocidade torna-se:

$$V = k[S_1][S_2] \qquad (8\text{-}5)$$

A partir da teoria do estado de transição, pode-se derivar uma expressão que relaciona a magnitude da constante de velocidade com a energia de ativação:

$$k = \frac{\mathrm{k}T}{h}\, e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \qquad (8\text{-}6)$$

onde k é a constante de Boltzmann e h é a constante de Planck. O ponto importante a salientar aqui é que a relação entre a constante de velocidade, k, e a energia de ativação, $\Delta G^{\ddagger}$, é inversa e exponencial. Em outras palavras, essa é a base para a afirmação de que uma energia de ativação menor significa uma velocidade de reação maior e vice-versa.

Agora vamos mudar o assunto de *o que* as enzimas fazem, para *como* elas o fazem.

Alguns princípios explicam o poder catalítico e a especificidade das enzimas

As enzimas são catalisadores extraordinários. Os aumentos da velocidade provocados pelas enzimas variam entre 5 e 17 ordens de magnitude (Tabela 8-5). As enzimas também são muito específicas, discriminando entre substratos com estruturas muito similares. Como esses aumentos, enormes e altamente seletivos, na velocidade das reações podem ser explicados? De onde vem a energia que diminui dramaticamente a energia de ativação para reações específicas?

Tabela 8-5 – Alguns valores do aumento da velocidade produzido por enzimas

Ciclofilina	10^{5}
Anidrase carbônica	10^{7}
Triose fosfato isomerase	10^{9}
Carboxipeptidase A	10^{11}
Fosfoglicomutase	10^{12}
Succinil-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidina monofosfato descarboxilase	10^{17}

A resposta para essas questões apresenta duas partes distintas, mas interligadas. A primeira diz respeito aos rearranjos das ligações covalentes durante a reação enzimática. Reações químicas dos mais variados tipos ocorrem entre o substrato e os grupos funcionais da enzima (cadeias laterais de aminoácidos específicos, íons metálicos e coenzimas). Os grupos funcionais catalíticos das enzimas podem formar uma ligação covalente transitória com um substrato e ativá-lo para a reação ou, então, algum grupo pode ser transferido transientemente do substrato para um grupo da enzima. Em muitos casos, essas reações somente ocorrem no centro ativo da enzima. Elas diminuem a energia de ativação (e, portanto, aceleram a reação), propiciando um caminho reacional alternativo de energia mais baixa.

A segunda parte da resposta diz respeito às interações não-covalentes entre a enzima e o substrato. A maior parte da energia necessária para diminuir a energia de ativação é derivada de interações fracas, não-covalentes, entre o substrato e a enzima. O fator que de fato distingue as enzimas da maioria dos catalisadores não-enzimáticos é a formação de um complexo ES específico. A interação entre o substrato e a enzima nesse complexo é mediada pelas mesmas forças que estabilizam a estrutura protéica, incluindo as pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas (Capítulo 6). A formação de cada interação fraca no complexo ES é acompanhada por uma pequena liberação de energia livre que garante o grau de estabilidade para a interação. A energia derivada da interação enzima-substrato é chamada de **energia de ligação**, ΔG_B. O seu significado vai além de uma simples estabilização da interação enzima-substrato. *A energia de ligação é a maior fonte de energia livre usada pelas enzimas para diminuir a energia de ativação das reações.*

Dois princípios fundamentais e inter-relacionados fornecem uma explicação geral para o fato de as enzimas utilizarem a energia de ligação não-covalente.

1. A maior parte do poder catalítico das enzimas é derivada, em última instância, da energia livre liberada na formação das múltiplas ligações fracas e interações entre a enzima e o seu substrato. Essa energia de ligação contribui tanto para a especificidade como para a catálise.

2. As interações fracas são otimizadas no estado de transição da reação. Os centros ativos das enzimas são complementares não aos respectivos substratos *per si*, mas aos estados de transição pelos quais os substratos passam à medida que são transformados em produtos durante as reações enzimáticas.

Esses aspectos são críticos para a compreensão da ação das enzimas e agora eles se tornarão o foco da nossa atenção.

As interações fracas entre a enzima e o substrato são otimizadas no estado de transição

Como uma enzima utiliza a energia de ligação para diminuir a energia de ativação da reação? Embora a formação do complexo ES não seja a explicação adequada, algumas das primeiras considerações dos mecanismos enzimáticos começaram com essa premissa. Os estudos sobre a especificidade das enzimas desenvolvidos por Emil Fischer levaram-no a propor, em 1894, que as enzimas eram estruturalmente complementares aos seus substratos, de tal forma que se ajustariam tal qual "fechadura e chave" (Fig. 8-4).

Essa premissa elegante de que a interação específica (exclusiva) entre duas moléculas biológicas é mediada por superfícies moleculares com formas complementares influenciou fortemente o desenvolvimento da bioquímica e tais interações permanecem no cerne de muitos processos bioquímicos. Entretanto, a hipótese "fechadura e chave" pode gerar confusão quando aplicada à catálise enzimática. Uma enzima totalmente complementar a seu substrato seria uma enzima muito pouco eficiente.

Considere uma reação imaginária, a quebra de um bastão de metal magnetizado. A reação não-catalisada está mostrada na Figura 8-5a. Vamos analisar duas enzimas imaginárias — duas "bastonases" — que catalisam essa reação e ambas empregando forças magnéticas como modelo para a energia de ligação empregada pelas enzimas reais. Vamos considerar inicialmente uma enzima perfeitamente complementar ao substrato (Fig. 8-5b). O centro ativo dessa "bastonase" é uma cavidade delimitada por magnetos. Para reagir (quebrar), o bastão precisa atingir o estado de transição da reação, mas ele se ajusta muito firmemente ao sítio ativo que não pode se dobrar. Isso porque o dobramento do bastão eliminaria parte das interações magnéticas entre ele e a enzima. Esse tipo de enzima *impede* a reação, uma vez que, na realidade, estabiliza o substrato. Num diagrama de coordenadas da reação (Fig. 8-5b), esse tipo de complexo ES corresponderia a um poço de energia do qual o substrato dificilmente escaparia. Esse tipo de enzima seria inútil.

A noção moderna de catálise enzimática, proposta inicialmente por Haldane em 1930, foi elaborada por Linus Pauling, em 1946: a fim de catalisar reações, uma enzima deve ser complementar ao *estado de transição*. Isso significa que as interações ótimas (por meio de ligações fracas) entre o substrato e a enzima ocorrem apenas no estado de transição. A Figura 8-5c mostra como uma enzima desse tipo pode trabalhar. O bastão de metal liga-se à enzima, mas algumas poucas interações magnéticas são usadas para formar o complexo ES. O substrato ligado precisa ainda receber um aumento de energia livre para

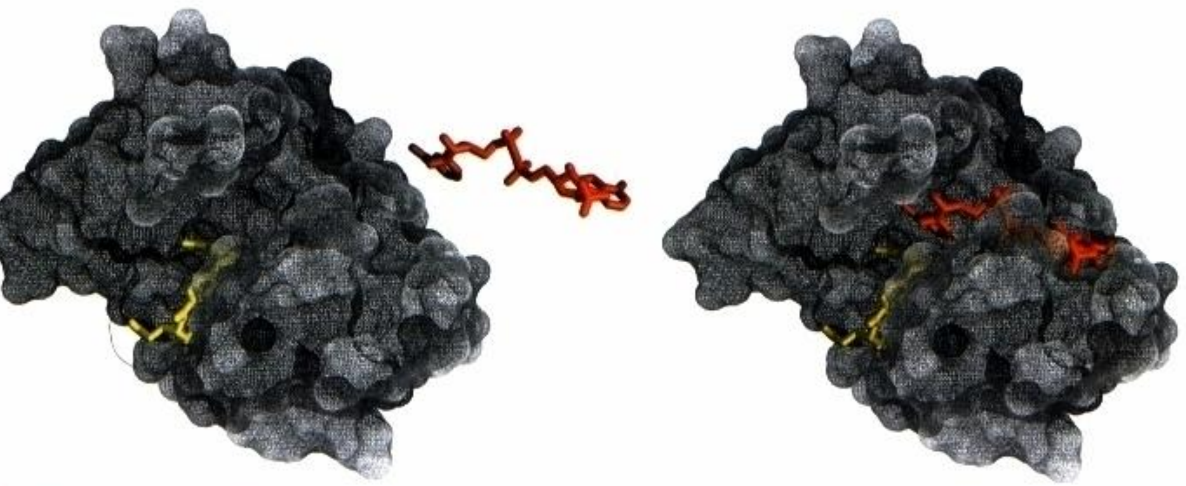
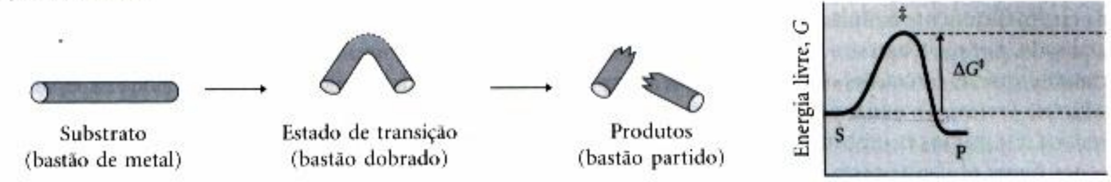
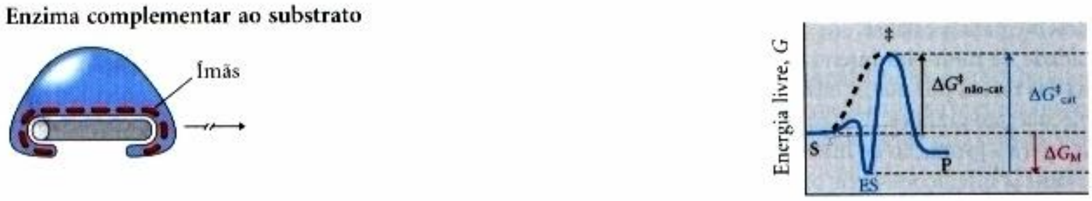


Figura 8-4 – Formas complementares de um substrato e seu sítio ativo em uma enzima. A enzima diidrofolato redutase é mostrada com o seu substrato NADP$^+$ (vermelho) não ligado (à esquerda) e ligado (à direita). Também é visível um outro substrato ligado à enzima, o tetraidrofolato (amarelo). O NADP$^+$ liga-se a uma cavidade que é complementar à sua forma e propriedades iônicas. Na realidade, a complementaridade entre a proteína e o ligante (neste caso, o substrato) raramente é perfeita, como já visto no Capítulo 7. A interação de uma proteína com um ligante freqüentemente envolve mudanças na conformação de uma ou ambas as moléculas, um processo denominado ajuste induzido. Essa *falta* de uma complementaridade perfeita entre a enzima e o substrato (não evidenciada nesta figura) é importante para a catálise enzimática.

(a) Sem enzima



(b) Enzima complementar ao substrato



(c) Enzima complementar ao estado de transição

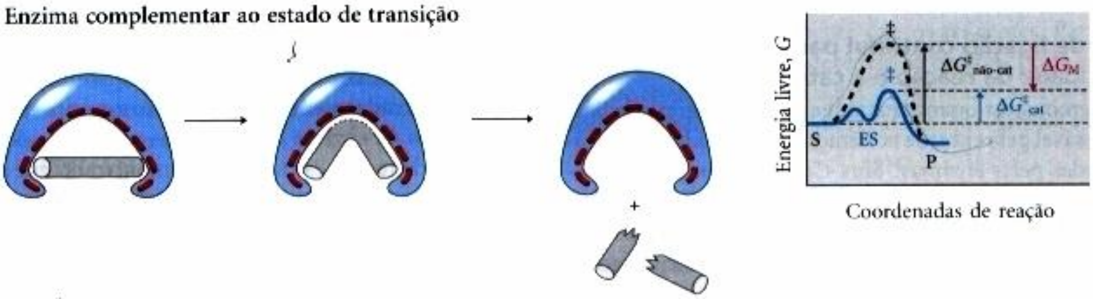


Figura 8-5 – Uma enzima imaginária ("bastonase") projetada para catalisar a quebra de um bastão de metal. (**a**) Para ser quebrado, primeiramente o bastão deve ser dobrado (o estado de transição). Em ambos os exemplos de "bastonase", as interações magnéticas fazem o papel das interações por ligações fracas entre enzima e substrato. (**b**) Uma "bastonase" que apresenta uma cavidade magnetizada com estrutura complementar à estrutura do bastão (o substrato) estabiliza esse substrato. O dobramento do bastão é impedido pela atração magnética entre o bastão e a "bastonase". (**c**) Uma enzima complementar ao estado de transição da reação ajuda a desestabilizar o bastão, contribuindo para a catálise da reação. A energia de ligação das interações magnéticas compensa o aumento de energia livre necessária para dobrar o bastão. Os diagramas de coordenadas da reação (à direita) mostram as conseqüências energéticas da complementaridade ao substrato *versus* a complementaridade ao estado de transição. O termo ΔG_M representa a diferença entre as energias dos estados de transição da reação não-catalisada e da catalisada e provém das interações magnéticas entre o bastão e a "bastonase". Quando a enzima é complementar ao substrato (**b**), o complexo ES é mais estável e tem menos energia livre no estado fundamental que o próprio substrato. O resultado é um *aumento* na energia de ativação.

atingir o estado de transição. Assim, o aumento em energia livre necessário para dobrar o bastão e quebrar parcialmente a sua conformação é compensado ou "pago" pelas interações magnéticas (energia de ligação) que se formam entre a enzima e o substrato no estado de transição. Muitas dessas interações envolvem partes do bastão que estão longe do ponto de rompimento. Assim sendo, as interações entre a "bastonase" e as regiões não-reativas do bastão fornecem parte da energia necessária para o rompimento do bastão. Esse "pagamento de energia" é traduzido em uma menor energia de ativação real e uma maior velocidade de reação.

As enzimas reais trabalham segundo um princípio análogo. Algumas interações fracas são formadas no complexo ES, mas a totalidade das interações fracas que se estabelecem entre o substrato e a enzima é estabelecida apenas quando o substrato atinge o estado de transição. A energia livre (energia de ligação) liberada pela formação dessas interações supre parcialmente a energia requerida para se atingir o topo da colina de energia. O somatório da energia de ligação desfavorável (positiva), $\Delta G^{\ddagger}$, e favorável (negativa), ΔG_B, resulta em uma energia de ativação *líquida* menor (Fig. 8-6). Mesmo para a enzima, o estado de transição não é uma espécie estável, mas um breve instante que o

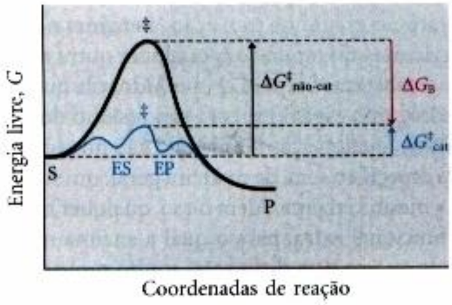


Figura 8-6 – O papel da energia de ligação na catálise. Para diminuir a energia de ativação de uma reação, o sistema precisa adquirir uma quantidade de energia equivalente à diminuição de $\Delta G^{\ddagger}$. A maior parte dessa energia provém da energia de ligação (ΔG_B) e é disponibilizada pela formação de interações não-covalentes fracas entre o substrato e a enzima no estado de transição. O significado de ΔG_B é análogo ao de ΔG_M na Figura 8-5.

substrato gasta para atingir o topo da barreira de energia. A reação catalisada enzimaticamente é muito mais rápida que o processo não-catalisado, porque a barreira é muito menor. O princípio importante é que *as interações de ligações fracas entre a enzima e o substrato fornecem a maior parte da força que dirige a catálise enzimática*. Os grupos no substrato que são envolvidos nessas interações fracas podem estar a uma certa distância das ligações que são quebradas ou mudadas. As interações fracas que se formam apenas no estado de transição são as que contribuem fundamentalmente para a catálise.

A necessidade de múltiplas interações fracas para dirigir a catálise é uma das razões por que as enzimas (e algumas coenzimas) são moléculas tão grandes. A enzima deve fornecer os grupos funcionais para a formação de interações iônicas, pontes de hidrogênio e outras interações, bem como posicionar precisamente esses grupos de tal forma que a energia de ligação seja otimizada no estado de transição.

A energia de ligação contribui para a especificidade da reação e a catálise

É possível demonstrar quantitativamente que a energia de ligação é responsável pela enorme aceleração da velocidade das reações catalisadas pelas enzimas? Sim. Como um ponto de referência, a Equação 8-6 permite calcular que $\Delta G^{\ddagger}$ deve diminuir aproximadamente 5,7kJ/mol para acelerar cerca de dez vezes uma reação de primeira ordem, sob as condições comumente encontradas nas células. A energia disponível devido à formação de uma única interação fraca geralmente é da ordem de 4 a 30kJ/mol. A energia total disponível, devido à formação de um certo número dessas interações, provavelmente é suficiente para diminuir a energia de ativação de cerca de 60 a 100kJ/mol, requerida para explicar os grandes aumentos na velocidade observados para muitas enzimas.

A mesma energia de ligação que fornece a energia para a catálise também é responsável pela **especificidade**, a habilidade da enzima em discriminar entre o substrato e uma outra molécula competidora. Conceitualmente, a especificidade é fácil de ser diferenciada da catálise, mas essa distinção é muito mais difícil de ser feita experimentalmente, porque a catálise e a especificidade são originárias do mesmo fenômeno. Se o centro ativo de uma enzima tem grupos funcionais arranjados de forma otimizada para formar uma variedade de interações fracas com um dado substrato no estado de transição, a enzima não será capaz de interagir do mesmo modo com qualquer outra molécula. Por exemplo, se o substrato tem um grupo hidroxila que forma uma ponte de hidrogênio específica com um resíduo de ácido glutâmico na enzima, qualquer molécula que não possuir aquele grupo hidroxila específico será, de maneira geral, um substrato mais pobre para a mesma enzima. Além disso, qualquer molécula com um grupo funcional extra, para o qual a enzima não apresenta uma cavidade ou um sítio de ligação, muito provavelmente será excluída da enzima. Geralmente, a *especificidade* é derivada da formação de múltiplas interações fracas entre a enzima e a molécula de seu substrato específico.

Os princípios gerais já descritos podem ser ilustrados por uma grande variedade de mecanismos catalíticos conhecidos. Esses mecanismos não são mutuamente exclusivos e uma dada enzima pode incorporar vários deles em seu mecanismo de ação. Geralmente é difícil quantificar a contribuição de um dado mecanismo catalítico para a velocidade e/ou especificidade de uma determinada reação catalisada enzimaticamente.

A energia de ligação é a força impulsionadora dominante em vários mecanismos e ela pode ser o principal, se não o único, contribuinte para a catálise. Vamos considerar o que é necessário acontecer para que a reação ocorra. Os fatores físicos e termodinâmicos importantes que contribuem para o $\Delta G^{\ddagger}$, a barreira energética, incluem: (1) a mudança na entropia, na forma de movimento de liberdade de duas moléculas em solução; (2) a camada de solvatação de moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio que envolvem e ajudam a estabilizar a maioria das biomoléculas em solução aquosa; (3) a distorção dos substratos que precisa ocorrer em muitas reações, e (4) a necessidade de se obter um alinhamento adequado dos grupos catalíticos funcionais na enzima. A energia de ligação pode ser usada para vencer todas essas barreiras.

A vantagem mais evidente da ligação dos substratos à enzima é uma grande redução nos movimentos relativos, ou **redução da entropia**, desses substratos. A energia de ligação mantém os substratos orientados adequadamente para reagir. Isso representa uma importante contribuição à catálise, uma vez que as colisões produtivas entre as moléculas em solução podem ser muito raras. Esse alinhamento preciso do substrato sobre a superfície da enzima é devido à grande quantidade de interações fracas entre cada molécula de substrato e grupos estrategicamente localizados na enzima que fixam as moléculas de substrato na posição adequada. Estudos têm demonstrado que a restrição do movimento de dois reagentes pode produzir aumentos de velocidade da ordem de 10^8M (Fig. 8-7).

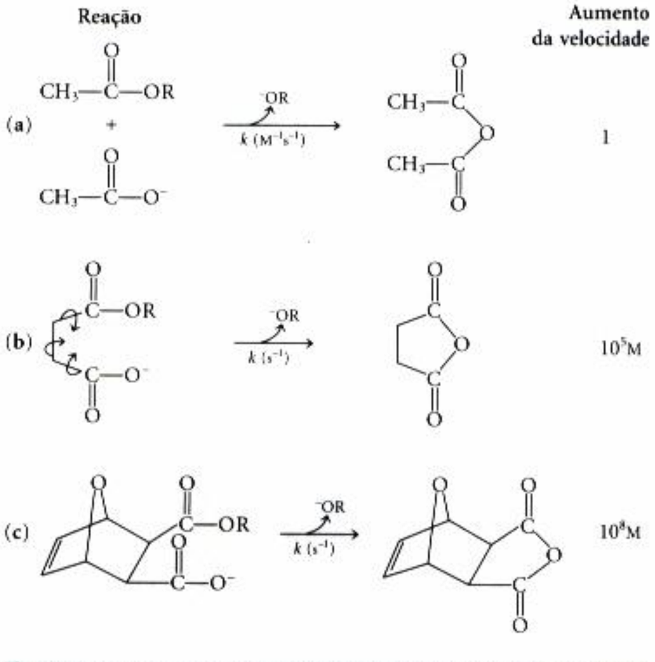


Figura 8-7 – Aumento da velocidade por meio da redução da entropia. São representadas reações de um éster com um grupo carboxílico para formar um anidrido. O grupo R é o mesmo em cada caso. (**a**) Para esta reação bimolecular, a constante de velocidade é de segunda ordem com unidade $M^{-1}s^{-1}$. (**b**) Quando os dois grupos reagentes estão na mesma molécula, a reação é muito mais rápida. Para esta reação unimolecular, a unidade de k é s^{-1}. Dividindo-se a constante de velocidade de (**b**) pela constante de velocidade de (**a**), tem-se um aumento da velocidade de cerca de 10^5M (a unidade molaridade é resultante do fato que foi comparada uma reação unimolecular com outra bimolecular). Colocando-se de outro modo, se o reagente em (**b**) estivesse presente em uma concentração 1M, os grupos reagentes *se comportariam* como se estivessem presentes em uma concentração 10^5M. Embora o reagente em (**b**) apresente livre rotação em três ligações (mostradas com setas curvas), isso ainda representa uma substancial redução da entropia em relação a (**a**). Se as ligações que giram em (**b**) ficam impedidas como em (**c**), a entropia é reduzida mais ainda e a reação exibe um aumento de velocidade de 10^8M em relação a (**a**).

A formação de ligações fracas entre o substrato e a enzima também resulta na **dessolvatação** do substrato. As interações enzima-substrato substituem a maior parte (ou até mesmo todas) das pontes de hidrogênio existentes entre o substrato e a água.

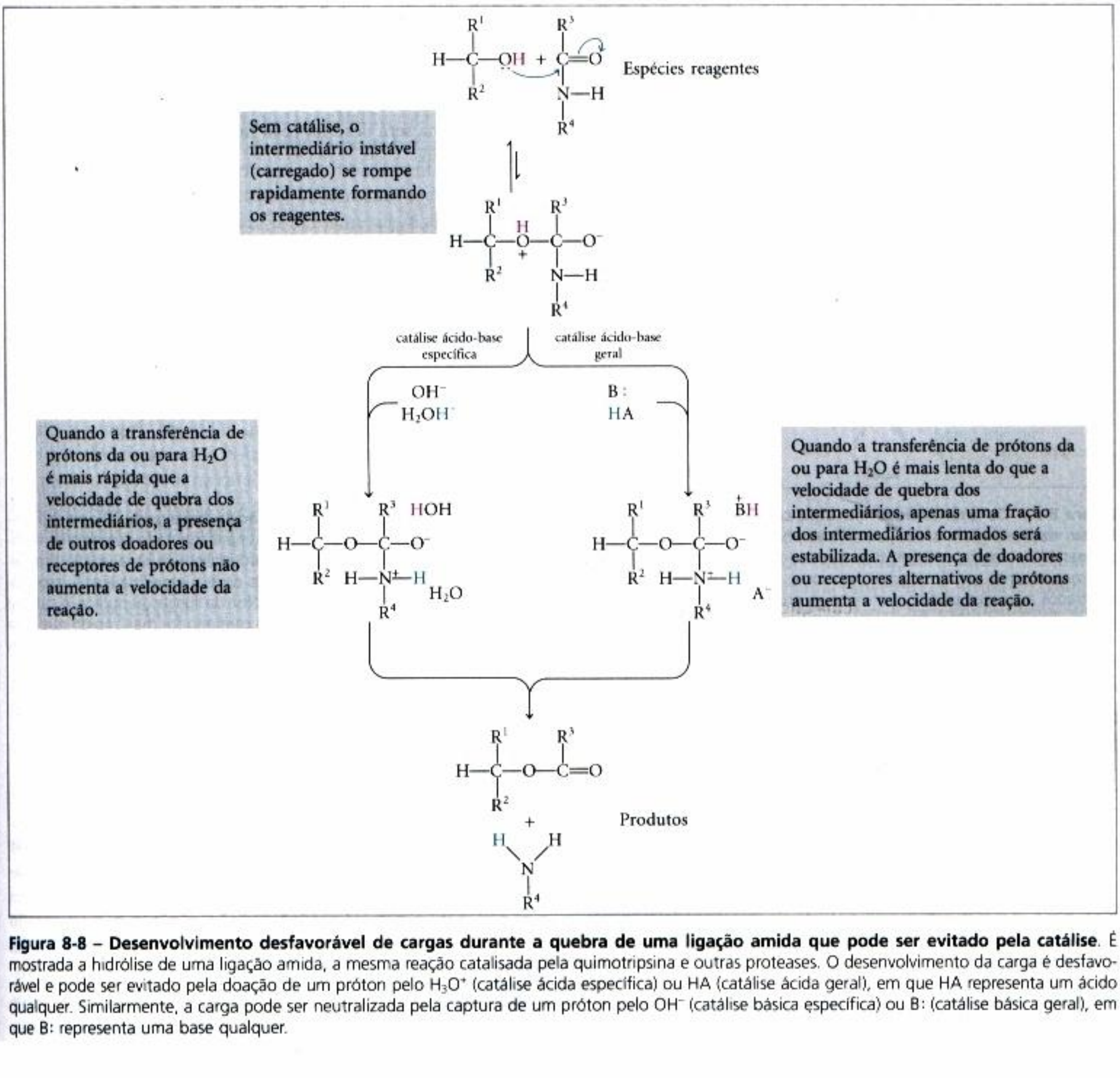
A energia de ligação envolvendo as interações fracas formadas apenas no estado de transição da reação ajuda a compensar termodinamicamente qualquer distorção (fundamentalmente uma redistribuição de elétrons) que o substrato deva sofrer para reagir.

Finalmente, a própria enzima pode sofrer mudanças conformacionais induzidas pelas múltiplas interações fracas com o substrato, quando da ligação com o substrato. Esse fato é denominado de **ajuste induzido**, um mecanismo postulado por Daniel Koshland, em 1958. O ajuste induzido serve para colocar grupos funcionais específicos da enzima em uma posição apropriada para catalisar a reação. A mudança conformacional também permite a formação de interações adicionais por ligações fracas no estado de transição. Em quaisquer desses casos, a nova conformação apresenta propriedades catalíticas aumentadas. Como vimos, o ajuste induzido é uma característica comum da ligação reversível dos ligantes às proteínas (Capítulo 7). O ajuste induzido também é importante na interação de quase todas as enzimas com os seus substratos.

Grupos catalíticos específicos contribuem para a catálise

Uma vez que o substrato se liga à enzima, os grupos catalíticos funcionais, adequadamente posicionados, auxiliam a quebra e a formação de ligações por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo a catálise ácido-base geral, a catálise covalente e a catálise por íons metálicos. Esses são mecanismos distintos daqueles baseados na energia de ligação, uma vez que geralmente envolvem uma interação *covalente* transiente com o substrato ou uma transferência de grupos do substrato ou para o substrato.

Catálise ácido-base geral. Muitas reações bioquímicas envolvem a formação de intermediários carregados instáveis que tendem a se transformar rapidamente em suas espécies reagentes constituintes, impedindo assim a reação (Fig. 8-8). Esses intermediários carregados freqüentemente podem ser estabilizados pela transferência (retirada ou adição) de prótons do substrato ou de um intermediário, para formar espécies que se quebram em produtos mais rapidamente que os reagentes. Para as reações não-enzimáticas, a transferência de prótons pode envolver apenas os constituintes da água ou também outros doadores ou aceptores fracos de prótons. A catálise que envolve apenas os íons



Sem catálise, o intermediário instável (carregado) se rompe rapidamente formando os reagentes.

Quando a transferência de prótons da ou para H_2O é mais rápida que a velocidade de quebra dos intermediários, a presença de outros doadores ou receptores de prótons não aumenta a velocidade da reação.

Quando a transferência de prótons da ou para H_2O é mais lenta do que a velocidade de quebra dos intermediários, apenas uma fração dos intermediários formados será estabilizada. A presença de doadores ou receptores alternativos de prótons aumenta a velocidade da reação.

Figura 8-8 – Desenvolvimento desfavorável de cargas durante a quebra de uma ligação amida que pode ser evitado pela catálise. É mostrada a hidrólise de uma ligação amida, a mesma reação catalisada pela quimotripsina e outras proteases. O desenvolvimento da carga é desfavorável e pode ser evitado pela doação de um próton pelo H_3O^+ (catálise ácida específica) ou HA (catálise ácida geral), em que HA representa um ácido qualquer. Similarmente, a carga pode ser neutralizada pela captura de um próton pelo OH^- (catálise básica específica) ou B: (catálise básica geral), em que B: representa uma base qualquer.

H^+ (H_3O^+) ou OH^-, presentes na água, é denominada **catálise ácido-base específica**. Se a transferência de prótons entre o intermediário e a água é mais rápida que a transformação do intermediário nos reagentes, o intermediário será efetivamente estabilizado todas as vezes que se formar. Desse modo, nenhuma catálise adicional, mediada por outros receptores ou doadores de prótons, ocorrerá. Entretanto, em muitos casos, apenas a participação da água não é suficiente. O termo **catálise ácido-base geral** refere-se a transferências de prótons mediadas por outras classes de moléculas. Para reações não-enzimáticas em soluções aquosas, isso ocorre apenas quando o intermediário instável da reação se transforma nos reagentes com uma velocidade maior com que os prótons são transferidos da água ou para a água. Nessas situações, vários ácidos orgânicos fracos podem suplementar a água como doadores de prótons, ou, ainda, bases orgânicas fracas podem servir como aceptoras de prótons.

No centro ativo de uma enzima, um certo número de cadeias laterais de aminoácidos pode atuar tanto como doador quanto como aceptor de prótons (Fig. 8-9). Esses grupos podem ser posicionados precisamente no centro ativo de uma enzima, permitindo a transferência de prótons e garantindo aumentos na velocidade da reação da ordem de 10^2 a 10^5. Esse tipo de catálise ocorre com a maioria das enzimas. De fato, as transferências de prótons são as reações bioquímicas mais comuns.

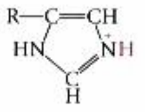
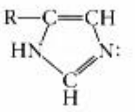
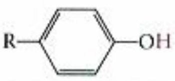
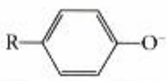
Resíduo de aminoácido	Forma ácida geral (doador de próton)	Forma básica geral (aceptor de próton)
Glu, Asp	R—COOH	$R{-}COO^-$
Lys, Arg	$R{-}\overset{+}{N}H_3$	$R{-}\ddot{N}H_2$
Cys	R—SH	$R{-}S^-$
His		
Ser	R—OH	$R{-}O^-$
Tyr		

Figura 8-9 – Os aminoácidos em uma catálise ácido-base geral. Muitas reações orgânicas são promovidas por doadores de prótons (ácidos gerais) ou aceptores de prótons (bases gerais). Os sítios catalíticos de algumas enzimas contêm grupos funcionais de aminoácidos, como os mostrados aqui, que podem participar no processo catalítico como doadores ou aceptores de prótons.

Catálise covalente. Neste tipo de catálise é formada uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Considere a hidrólise da ligação química entre os grupos A e B:

$$A{-}B \xrightarrow{H_2O} A + B$$

Na presença de um catalisador covalente (uma enzima com um grupo nucleofílico X:), a reação ocorre da seguinte forma:

$$A{-}B + X{:} \longrightarrow A{-}X + B \xrightarrow{H_2O} A + X{:} + B$$

Isso altera o caminho da reação e resulta em catálise apenas quando o novo caminho tem uma energia de ativação menor que aquele da reação não-catalisada. Assim, os dois novos passos precisam ser mais rápidos que os da reação não-catalisada. Algumas cadeias laterais de aminoácidos, incluindo as da Figura 8-9, e os grupos funcionais de alguns co-fatores de enzimas podem servir como nucleófilos na formação de ligações covalentes com os substratos. Esses complexos covalentes sempre sofrem reações posteriores para regenerar a enzima livre. A ligação covalente formada entre a enzima e o substrato pode ativar esse substrato para uma reação subseqüente de uma maneira particularmente específica para o grupo ou coenzima envolvidos.

Catálise por íons metálicos. Os metais firmemente ligados à molécula da enzima ou captados da solução junto com o substrato podem participar de várias maneiras na catálise. As interações iônicas entre um metal ligado à enzima e o substrato podem ajudar a orientar o substrato para a reação ou estabilizar os estados de transição carregados eletricamente. O uso de interações por ligações fracas entre o metal e o substrato é similar à utilização da energia de ligação enzima-substrato já descrita anteriormente. Os metais podem também mediar reações de oxirredução por meio de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. Cerca de um terço das enzimas conhecidas requer um ou mais íons metálicos para sua atividade catalítica.

A maioria das enzimas emprega uma combinação de várias estratégias catalíticas para aumentar a velocidade da reação. Um bom exemplo do uso das catálises covalente e ácido-base geral é a reação catalisada pela quimotripsina. O primeiro é a quebra de uma ligação peptídica que é acompanhada pela formação de uma ligação covalente entre um resíduo de serina da enzima e parte do substrato. A reação é acelerada pela catálise básica geral envolvendo outros grupos na enzima (Fig. 8-10). A reação da quimotripsina será descrita com maiores detalhes mais adiante neste capítulo.

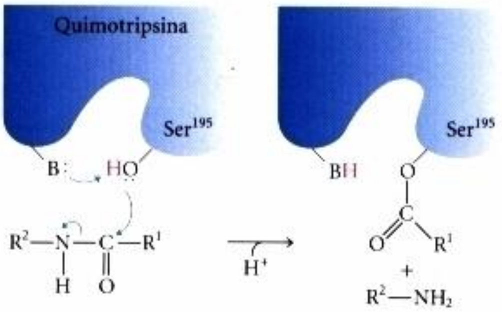


Figura 8-10 – Catálises covalente e ácido-base geral. O primeiro passo da reação catalisada pela quimotripsina é chamado de passo da acilação. O grupo hidroxila da Ser^{195} é o nucleofílico em uma reação acelerada pela catálise básica geral (a base é a cadeia lateral da His^{57}). Isso proporciona um novo caminho para a hidrólise da ligação peptídica. A catálise somente ocorre se cada passo do novo caminho for mais rápido que o da reação não-catalisada. A reação da quimotripsina está descrita com mais detalhes na Figura 8-19.

A Cinética Enzimática como uma Abordagem para a Compreensão do Mecanismo de Ação das Enzimas

Múltiplas abordagens são comumente empregadas para estudar o mecanismo de ação de uma enzima purificada. O conhecimento da estrutura tridimensional da proteína fornece informações importantes e o valor dessa informação estrutural é aumentado significativamente pelos conhecimentos obtidos por meio da química de proteína clássica e pelos métodos modernos de mutagênese sítio dirigida (mudança da seqüência de aminoácidos de uma proteína por meio da engenharia genética; veja Capítulo 29). Essas tecnologias permitem ao enzimologista examinar o papel individual dos aminoácidos tanto na estrutura da enzima como na sua ação catalítica. Entretanto, a abordagem central para estudar o mecanismo de uma reação catalisada por uma enzima é determinar a *velocidade* da reação e como ela se altera em função de mudanças nos parâmetros experimentais, uma disciplina conhecida como **cinética enzimática**. Essa é a abordagem mais antiga para a compreensão dos mecanismos enzimáticos e continua sendo muito importante até hoje. O que segue é uma introdução básica à cinética das reações catalisadas por enzimas. Para um estudo mais avançado devem ser consultadas as referências citadas no final do capítulo.

A concentração do substrato afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas

Um dos principais fatores que afetam a velocidade de uma reação *in vitro*, catalisada por uma enzima purificada, é a concentração do substrato, [S]. Entretanto, estudar os efeitos da concentração do substrato é complicado pelo fato de [S] variar durante o curso de uma dada reação, à medida que o substrato é convertido em produto. Uma abordagem simplificada em experimentos cinéticos é medir a **velocidade inicial** da reação, designada por V_0, quando [S] é geralmente muito maior que a concentração da enzima, [E]. Assim, se o tempo de reação for suficientemente curto, as mudanças na [S] serão desprezíveis, portanto a [S] pode ser considerada constante.

O efeito em V_0 provocado pela variação da [S], quando a concentração de enzima é mantida constante, está mostrado na Figura 8-11. Em concentrações relativamente baixas de substrato, V_0 aumenta quase linearmente com o aumento da [S]. Em altas concentrações de substrato, V_0 aumenta cada vez menos em resposta aos aumentos da [S]. Finalmente, é alcançado um ponto acima do qual ocorrem aumentos insignificantes de V_0, à medida que a [S] aumenta. Esse patamar atingido para tais valores de V_0 é muito próximo da **velocidade máxima, $V_{máx}$**.

O complexo ES é fundamental para a compreensão desse comportamento cinético, já que ele foi o ponto de partida para a discussão da catálise enzimática. O perfil cinético apresentado na Figura 8-11 levou Victor Henri, seguindo as diretrizes de Wurtz, a propor, em 1903, que a combinação de uma enzima com a molécula de seu substrato para formar o complexo ES é um passo obrigatório na catálise enzimática. Em 1913 essa idéia foi expandida em uma teoria geral da ação das enzimas por Leonor Michaelis e Maud Menten. Eles postularam que inicialmente a enzima se combina reversivelmente com o substrato para formar o complexo enzima-substrato, em um passo reversível relativamente rápido:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (8\text{-}7)$$

Em uma segunda etapa lenta, o complexo ES então se quebra liberando a enzima livre, o produto da reação, P:

$$ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (8\text{-}8)$$

Como a segunda reação é mais lenta (Eq. 8-8), ela limita a velocidade da reação enzimática. Assim, a velocidade da reação enzimática deve ser proporcional à concentração da substância que reage no segundo passo, isto é, ES.

Em qualquer instante de uma reação catalisada enzimaticamente, a enzima existe em duas formas, a não ligada ao substrato, ou forma livre E, e a forma ligada ao substrato, ES. Em baixas [S], a maior parte da enzima está na forma livre E. Nessas condições, a velocidade da reação será proporcional à [S] porque o equilíbrio da Equação 8-7 é deslocado na direção da formação de mais ES, à medida que a [S] aumenta. A velocidade inicial máxima da reação ($V_{máx}$) será atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma do complexo ES e a concentração da enzima livre E for significativamente pequena. Nessas condições, a enzima está "saturada" com seu substrato e a velocidade da reação não aumenta mais com novos aumentos da [S]. Essa condição existirá sempre que a [S] for suficientemente alta para manter todas as moléculas de enzima na forma combinada com o substrato, ES. Em seguida, o complexo ES transforma-se no produto P e a enzima é liberada para catalisar a transformação de outra molécula de substrato. O efeito de saturação é uma característica que distingue os catalisadores enzimáticos e é o responsável pelo patamar observado na Figura 8-11. Essa condição de saturação existirá sempre que [S] for suficientemente alta.

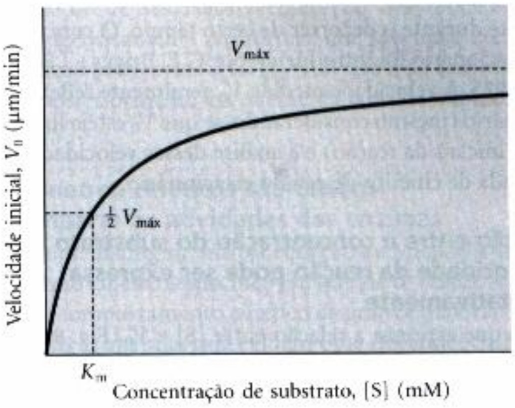


Figura 8-11 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada enzimaticamente. Por meio deste tipo de gráfico, a $V_{máx}$ pode ser determinada apenas aproximadamente, isso porque V_0 se aproxima mas nunca chega a atingir $V_{máx}$. A concentração de substrato, em que a V_0 é a metade da $V_{máx}$, é K_m, a constante de Michaelis-Menten. A concentração da enzima em um experimento como esse é geralmente tão baixa que [S] >> [E] mesmo quando [S] é descrita como pequena ou relativamente pequena. As unidades são típicas para reações catalisadas enzimaticamente e apresentadas apenas para ilustrar o significado V_0 e [S] (note que a curva descreve *parte* de uma hipérbole retangular, com uma das assíntotas em $V_{máx}$. Se a curva continuasse para concentrações abaixo de [S] = 0, ela se aproximaria de uma assintota vertical quando [S] = $-K_m$).

Leonor Michaelis
(1875-1949)

Maud Menten
(1879-1960)

Quando a enzima é misturada com um grande excesso de substrato, existe um período inicial, o **estado pré-estacionário**, no qual a concentração de ES aumenta. Esse período é muito curto para poder ser facilmente observado. A reação atinge rapidamente o **estado estacionário**, em que a [ES] (e a concentração de quaisquer outros intermediários) permanecerá praticamente constante durante o decorrer de certo tempo. O conceito de estado estacionário foi introduzido por G.E. Briggs e J.B.S. Haldane em 1925. A velocidade medida V_0 geralmente reflete o estado estacionário (mesmo considerando-se que V_0 esteja limitada aos tempos iniciais da reação) e a análise dessas velocidades iniciais é chamada de **cinética de estado estacionário**.

A relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação pode ser expressa quantitativamente

A curva que expressa a relação entre [S] e V_0 (Fig. 8-11) tem a mesma forma geral para a maioria das enzimas (ela se aproxima de uma hipérbole retangular) que pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten. Michaelis e Menten derivaram essa equação partindo de sua hipótese básica de que o passo limitante da velocidade nas reações enzimáticas seria a quebra do complexo ES para formar o produto e a enzima livre. A equação é

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]} \qquad (8\text{-}9)$$

Os termos importantes são [S], V_0, $V_{\text{máx}}$ e uma constante chamada de constante de Michaelis, K_m. Todos esses termos são facilmente medidos experimentalmente.

Nós desenvolveremos aqui a lógica básica e os passos algébricos da dedução moderna da equação de Michaelis-Menten, que inclui a consideração do estado estacionário introduzido por Briggs e Haldane. A dedução começa com as duas etapas básicas envolvidas na formação e na quebra de ES (Eqs. 8-7 e 8-8). Nos primeiros momentos da reação, a concentração do produto, [P], é negligenciável e, para simplificar, assumiremos que k_{-2} (que descreve a reação reversa de P para S) pode ser ignorada. Essa consideração não é crítica mas simplifica nossa tarefa. Assim, a reação geral se reduz a

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_2}{\rightleftharpoons} E + P \qquad (8\text{-}10)$$

V_0 é determinada pela quebra de ES para formar o produto, que por sua vez é determinado pela [ES]:

$$V_0 = k_2[ES] \qquad (8\text{-}11)$$

Como a [ES] na Equação 8-11 não é facilmente medida experimentalmente, é preciso encontrar uma expressão alternativa para [ES]. Primeiro, introduziremos o termo $[E_t]$ que representa a concentração total da enzima (a soma das concentrações da enzima livre e da ligada ao substrato). Desse modo, a concentração da enzima livre, ou não ligada ao substrato, pode ser representada por $[E_t] - [ES]$. Como a [S] geralmente é muito maior que a $[E_t]$, a quantidade de substrato ligada à enzima, em qualquer momento da reação, é desprezível quando comparada com a [S]. Tendo em vista essas considerações, os passos que se seguem conduzirão a uma expressão simples para V_0, em termos de parâmetros que podem ser facilmente medidos experimentalmente.

Passo 1. As velocidades de formação e quebra de ES são determinadas pelos passos governados pelas constantes de velocidade k_1 (formação) e $k_{-1} + k_2$ (desaparecimento), de acordo com as expressões:

$$\text{Velocidade de formação de ES} = k_1([E_t] - [ES])[S] \qquad (8\text{-}12)$$

$$\text{Velocidade de quebra de ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \qquad (8\text{-}13)$$

Passo 2. Considera-se agora que a velocidade inicial da reação reflete um estado estacionário em que a [ES] é constante, isto é, a velocidade de formação de ES é igual à velocidade de quebra de ES. Essa é a chamada consideração de estado estacionário. Assim, as expressões nas Equações 8-12 e 8-13 podem ser igualadas

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \qquad (8\text{-}14)$$

Passo 3. Desenvolveremos agora uma série de passos algébricos para resolver a Equação 8-14 em função da [ES]. Primeiramente, o lado esquerdo da equação é multiplicado e o lado direito é simplificado

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (8\text{-}15)$$

Adicionando-se o termo $k_1[ES][S]$ a ambos os lados da equação e simplificando

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (8\text{-}16)$$

Resolvendo esta equação em função da [ES]:

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \qquad (8\text{-}17)$$

Simplificando esta última expressão e combinando-se todas as constantes de velocidade em um único termo:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1} \qquad (8\text{-}18)$$

O termo $(k_2 + k_{-1})/k_1$ é definido como a **constante de Michaelis, K_m**. A substituição desse valor na Equação 8-18 simplifica a expressão para

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (8\text{-}19)$$

Passo 4. V_0 agora pode ser expressa em termos da [ES]. Substituindo-se a [ES] da Equação 8-11 pelo lado direito da Equação 8-19 obtém-se

$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (8\text{-}20)$$

Esta equação ainda pode ser simplificada. Já vimos que a velocidade atingirá o ponto máximo quando a enzima estiver saturada, isto é, quando $[ES] = [E_t]$. Assim $V_{\text{máx}}$ pode ser definida como $k_2[E_t]$. Substituindo este valor na Equação 8-20 obtém-se:

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta é a **equação de Michaelis-Menten**, a **equação da velocidade** para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato. Ela é uma expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial V_0, a velocidade inicial máxima $V_{\text{máx}}$ e a concentração inicial de substrato [S], todas relacionadas pela constante de Michaelis, K_m. Note que o K_m tem unidade de concentração. Essa equação está realmente de acordo com resultados experimentais reais? Sim. Confirmaremos essa afirmação considerando situações limites em que a [S] é muito alta ou muito baixa, como mostrado na Figura 8-12.

Uma importante relação numérica emerge da equação de Michaelis-Menten no caso especial em que V_0 é exatamente a metade de $V_{\text{máx}}$ (Fig. 8-12). Então:

$$\frac{V_{\text{máx}}}{2} = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]} \qquad (8\text{-}21)$$

Dividindo por $V_{\text{máx}}$, obtém-se

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \qquad (8\text{-}22)$$

Resolvendo em função de K_m, obtém-se $K_m + [S] = 2[S]$, ou

$$K_m = [S], \quad \text{quando } V_0 = \tfrac{1}{2}V_{\text{máx}} \qquad (8\text{-}23)$$

Isto representa uma definição prática muito útil de K_m: o K_m é equivalente à concentração de substrato onde V_0 é igual à metade de $V_{\text{máx}}$.

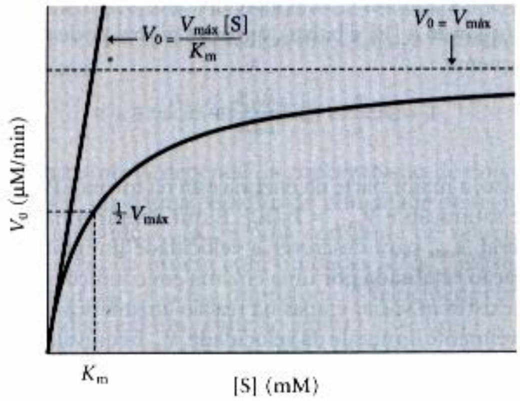


Figura 8-12 – Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação. O gráfico mostra os parâmetros cinéticos que definem os limites da curva em baixas e altas [S]. Em baixas [S], $K_m >> [S]$ e o termo [S] no denominador da equação de Michaelis-Menten (Eq. 8-9) torna-se insignificante. A equação pode ser simplificada para $V_0 = V_{\text{máx}}[S]/K_m$, e V_0 passa a ter uma dependência linear em função da [S], como pode ser observado nesta figura. Em [S] elevadas, onde $[S] >> K_m$, o termo K_m no denominador da equação de Michaelis-Menten torna-se insignificante e a equação pode ser simplificada para $V_0 = V_{\text{máx}}$. Isso é consistente com o patamar observado nas [S] elevadas. Portanto, a equação de Michaelis-Menten é consistente com a dependência observada de V_0 em relação a [S]. A forma da curva é definida pelos termos $V_{\text{máx}}/K_m$, quando a [S] é pequena, e apenas por $V_{\text{máx}}$, quando a [S] é alta.

A equação de Michaelis-Menten (Eq. 8-9) pode ser transformada algebricamente em formas que são mais úteis para a determinação prática de K_m e $V_{\text{máx}}$ (Adendo 8-1) e, como descreveremos posteriormente, na análise da ação de inibidores (veja Adendo 8-2).

Os parâmetros cinéticos são usados para comparar as atividades das enzimas

É importante distinguir entre a equação de Michaelis-Menten e o mecanismo cinético específico em que ele se baseia. A equação descreve o comportamento cinético da grande maioria das enzimas, e todas as enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de V_0 em relação a [S] são denominadas enzimas que seguem a **cinética de Michaelis-Menten.** A regra prática de que $K_m = [S]$ quando $V_0 = \frac{1}{2} V_{\text{máx}}$ (Eq. 8-23) é válida para todas as enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten (a maioria das exceções à cinética de Michaelis-Menten são as enzimas reguladoras, discutidas no final deste capítulo). Entretanto, a equação de Michaelis-Menten não depende do mecanismo de reação relativamente simples, de duas etapas, proposto por Michaelis e Menten (Eq. 8-10). Muitas enzimas que seguem a equação de Michaelis-Menten têm mecanismos de reação muito diferentes entre si, e enzimas que catalisam reações com seis ou oito etapas identificáveis freqüentemente exibem o mesmo comportamento cinético de estado estacionário. Mesmo considerando que a Equa-

Adendo 8-1

Transformações da equação de Michaelis-Menten: o gráfico dos duplos recíprocos

A equação de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

pode ser transformada algebricamente em equações que são mais úteis no tratamento gráfico dos dados experimentais. Uma transformação comum é obtida simplesmente invertendo-se os dois lados da equação de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{máx}}[S]}$$

Separando-se os componentes do numerador do lado direito da equação obtém-se

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}[S]} + \frac{[S]}{V_{\text{máx}}[S]}$$

que pode ser simplificada para:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

Esta forma da equação de Michaelis-Menten é chamada de **equação de Lineweaver-Burk.** Para as enzimas que obedecem a equação de Michaelis-Menten, o gráfico de $1/V_0$ *versus* $1/[S]$ (gráfico dos "duplos recíprocos" de V_0 *versus* [S] que usamos até agora) é representado por uma linha reta (Fig. 1). Essa linha tem uma inclinação de $K_m/V_{\text{máx}}$, um intercepto de $1/V_{\text{máx}}$ no eixo de $1/V_0$ e um intercepto de $-1/K_m$ no eixo de $1/[S]$. A representação dos duplos recíprocos, também chamada representação de Lineweaver-Burk, tem a grande vantagem de permitir uma determinação mais acurada de $V_{\text{máx}}$, que pode ser obtida apenas *aproximadamente* pelo gráfico V_0 *versus* [S] (veja Fig. 8-12).

Outras transformações da equação de Michaelis-Menten têm sido deduzidas, cada uma apresentando alguma vantagem particular na análise de dados de cinética enzimática (veja problema 11, pág. 223).

O gráfico dos duplos recíprocos para velocidades de reações enzimáticas é muito útil na diferenciação de diferentes mecanismos de reação enzimática (veja Fig. 8-14) e na análise de inibidores de enzimas (veja Adendo 8-2).

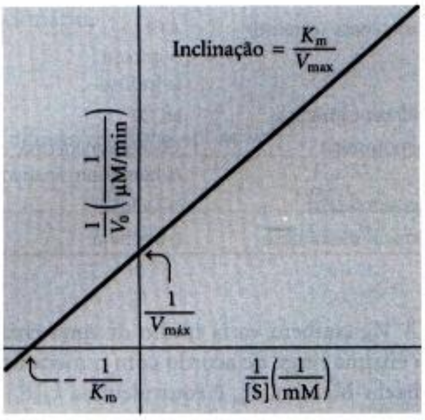


Figura 1 – O gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk.

ção 8-23 é verdadeira para muitas enzimas, a magnitude e o significado real de $V_{máx}$ e K_m podem variar de uma enzima para outra. Isso é uma limitação importante do modelo do estado estacionário para a cinética enzimática. $V_{máx}$ e K_m são parâmetros que podem ser obtidos experimentalmente para qualquer enzima, mas mesmo assim eles fornecem pouca informação sobre o número, a velocidade ou a natureza química das etapas discretas da reação. Não obstante, a cinética de estado estacionário representa a linguagem-padrão pela qual as eficiências catalíticas das enzimas são caracterizadas e comparadas. Trataremos agora da aplicação e interpretação e aplicação dos termos $V_{máx}$ e K_m.

Um método gráfico simples para se obter um valor aproximado para o K_m está mostrado na Figura 8-12. Um procedimento mais conveniente, usando o **gráfico dos duplos recíprocos**, está apresentado na Adendo 8-1. O K_m pode variar muito de enzima para enzima e até mesmo para diferentes substratos de uma mesma enzima (Tabela 8-6). O termo K_m muitas vezes é empregado (inadequadamente) como uma indicação da afinidade da enzima pelo seu substrato. O significado real do K_m depende de aspectos específicos do mecanismo de reação, tais como o número e as velocidades relativas dos passos individuais da reação. Para reações com duas etapas,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \qquad (8\text{-}24)$$

Quando k_2 é limitante da velocidade, $k_2 << k_{-1}$ e K_m se reduzem a k_{-1}/k_1, que é definida como a **constante de dissociação**, K_d, do complexo ES. Nos casos em que essas condições prevalecem, o K_m representa uma medida da afinidade da enzima pelo substrato no complexo ES. Entretanto, essas condições não se aplicam para a maioria das enzimas. Algumas vezes $k_2 >> k_{-1}$ e então $K_m = k_2/k_1$. Em outros casos, k_2 e k_{-1} são comparáveis e K_m permanece como uma função mais complexa das três constantes de velocidade (Eq. 8-24). Nesse caso, a equação de Michaelis-Menten e o comportamento característico da saturação da enzima ainda são válidos, mas o K_m não pode ser considerado como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato. Ainda mais comuns são os casos em que a reação ocorre por meio de etapas múltiplas após a formação do complexo ES. O K_m então se torna uma função muito complexa de muitas constantes de velocidade.

Tabela 8-6 – Valores de K_m para algumas enzimas e substratos

Enzima	Substrato	K_m (mM)
Catalase	H_2O_2	25
Hexoquinase (cérebro)	ATP	0,4
	D-glicose	0,05
	D-frutose	1,5
Anidrase carbônica	HCO_3^-	26
Quimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-benzoiltirosinamida	2,5
β-galactosidase	D-lactose	4,0
Treonina desidratase	L-treonina	5,0

A V_m também varia muito de uma enzima para outra. Se uma enzima reage de acordo com o mecanismo de duas etapas Michaelis-Menten, V_m é equivalente a $k_2[E_t]$, onde k_2 é a etapa limitante da velocidade. Entretanto, o número de etapas de reação e a identidade da(s) etapa(s) limitante(s) da velocidade podem variar de enzima para enzima. Por exemplo, considere uma situação muito comum na qual a liberação do produto, $EP \rightarrow E + P$, é limitante da velocidade. Nos instantes iniciais da reação (quando a [P] é baixa), a reação global pode ser descrita pelo esquema

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \overset{k_3}{\rightleftharpoons} E + P \qquad (8\text{-}25)$$

Neste caso, a maior parte da enzima está na forma EP em condições de saturação e $V_{máx} = k_3[E_t]$. É útil definir uma constante mais geral, $\boldsymbol{k_{cat}}$, para descrever a velocidade limitante de qualquer reação catalisada por uma enzima em condições de saturação. Se existirem várias etapas na reação enzimática e uma delas for visivelmente limitante da velocidade, k_{cat} é equivalente à constante de velocidade da etapa limitante. Para a reação da Equação 8-10, $k_{cat} = k_2$. Para a reação da Equação 8-25, $k_{cat} = k_3$. Quando várias etapas são parcialmente limitantes da velocidade, k_{cat} pode se transformar em uma função complexa de várias das constantes de velocidade que definem cada etapa individual da reação. Na equação de Michaelis-Menten, $k_{cat} = V_{máx}/[E_t]$ e a Equação 8-9 se transforma em

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (8\text{-}26)$$

A constante k_{cat} é uma constante de velocidade de primeira ordem cuja unidade é o recíproco do tempo. Ela também é chamada de **número de renovação** e é equivalente ao número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula da enzima, em uma dada unidade de tempo, quando a enzima está saturada pelo substrato. Os números de renovação de várias enzimas são apresentados na Tabela 8-7.

Tabela 8-7 – Número de renovação (k_{cat}) de algumas enzimas

Enzima	Substrato	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40.000.000
Anidrase carbônica	HCO_3^-	400.000
Acetilcolinesterase	Acetilcolina	140.000
β-lactamase	Benzilpenicilina	2.000
Fumarase	Fumarato	800
Proteína RecA (uma ATPase)	ATP	0,4

Os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m geralmente são úteis para o estudo e a comparação de diferentes enzimas independentemente de seus mecanismos de reação serem simples ou complexos. Cada enzima apresenta valores ótimos de k_{cat} e K_m que refletem o ambiente celular, a concentração do substrato normalmente encontrado *in vivo* pela enzima e a química da reação que está sendo catalisada.

Os parâmetros k_{cat} e K_m permitem avaliar a eficiência catalítica das enzimas, mas esses parâmetros isoladamente são insuficientes para essa tarefa. Duas enzimas que catalisam reações diferentes podem ter a mesma k_{cat} (número de renovação), embora as velocidades das reações não-catalisadas possam ser diferentes. Dessa forma, o aumento da velocidade provocado pela enzima pode ser muito diferente. Experimentalmente, o K_m de uma enzima tende a ser similar à concentração celular do seu substrato. Uma enzima que atua sobre um substrato presente em uma concentração muito baixa no interior da célula tenderá a ter um K_m muito menor que aquela que atua sobre um substrato que é mais abundante.

A melhor maneira de se comparar a eficiência catalítica de diferentes enzimas ou o número de renovação de diferentes substratos para uma mesma enzima é analisar a relação k_{cat}/K_m para as duas reações. Esse parâmetro, que algumas vezes é denominado **constante específica**, é a constante de velocidade para a conversão de E + S em E + P. Quando [S] << K_m, a Equação 8-26 se reduz à forma

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_t][S] \tag{8-27}$$

Neste caso, como V_0 depende da concentração de dois reagentes, $[E_t]$ e [S], ela é uma equação de velocidade de segunda ordem e a constante k_{cat}/K_m é uma constante de velocidade de reação de segunda ordem com unidades $M^{-1}s^{-1}$. Existe um limite superior para k_{cat}/K_m, imposto pela velocidade com que E e S se difundem em uma solução aquosa. Esse limite, controlado pela difusão, é da ordem de 10^8 a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$, e muitas enzimas apresentam o valor de k_{cat}/K_m próximo a esse intervalo (Tabela 8-8). Tais enzimas são consideradas cataliticamente perfeitas. Note que diferentes valores de k_{cat} e K_m podem produzir relações máximas.

Muitas enzimas catalisam reações que envolvem dois ou mais substratos

Já vimos como a [S] afeta a velocidade de uma reação enzimática simples (S → P) na qual participa apenas uma molécula de substrato. Entretanto, em muitas reações enzimáticas, duas (algumas vezes mais de duas) moléculas de substratos diferentes se ligam à enzima e participam da reação. Por exemplo, na reação catalisada pela hexoquinase, o ATP e a glicose são as moléculas de substrato e o ADP e a glicose-6-fosfato são os produtos:

$$\text{ATP} + \text{glicose} \longrightarrow \text{ADP} + \text{glicose-6-fosfato}$$

As velocidades dessas reações com dois substratos também podem ser analisadas pela abordagem de Michaelis-Menten. A hexoquinase tem um K_m característico para cada um dos seus dois substratos (Tabela 8-6).

As reações enzimáticas com dois substratos usualmente envolvem a transferência de um átomo ou um grupo funcional de um substrato para o outro. Tais reações ocorrem por meio de um ou vários caminhos diferentes. Em alguns casos, ambos os substratos estão ligados à enzima ao mesmo tempo, em algum instante da reação, formando um complexo ternário não-covalente (Fig. 8-13a). Esse complexo pode ser formado pela ligação dos substratos em uma seqüência ao acaso ou em uma ordem específica. Nenhum complexo ternário é formado se o primeiro substrato é convertido em produto e se dissocia antes da ligação do segundo substrato. Um exemplo é o mecanismo chamado pingue-pongue ou de dupla-troca (Fig. 8-13b). A cinética do estado estacionário freqüentemente pode ajudar na distinção entre essas possibilidades (Fig. 8-14).

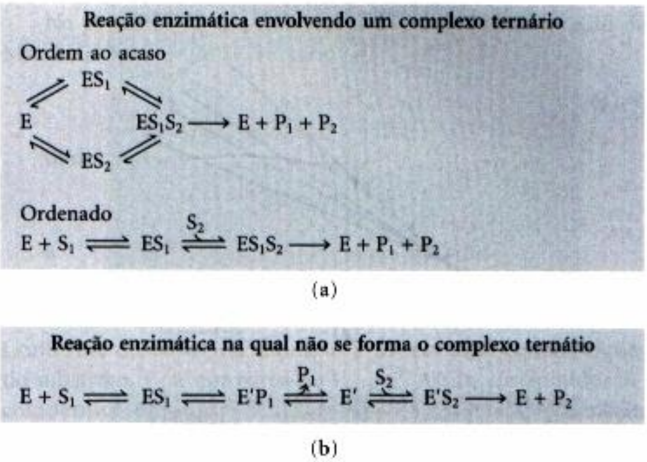

Reação enzimática envolvendo um complexo ternário
Ordem ao acaso
ES₁
E
ES₁S₂ ⟶ E + P₁ + P₂
ES₂
Ordenado
E + S₁ ⇌ ES₁ ⇌ ES₁S₂ ⟶ E + P₁ + P₂
S₂
(a)
Reação enzimática na qual não se forma o complexo ternátio
E + S₁ ⇌ ES₁ ⇌ E'P₁ ⇌ E' ⇌ E'S₂ ⟶ E + P₂
P₁
S₂
(b)

Figura 8-13 – Mecanismos comuns para reações com dois substratos catalisados enzimaticamente. Em (**a**) a enzima e ambos os substratos se juntam para formar um complexo ternário. Em uma associação ordenada, o substrato 1 deve ser ligado antes, para que o substrato 2 possa se ligar produtivamente. Em uma associação ao acaso, os substratos podem se ligar em qualquer ordem. Em (**b**), um complexo enzima-substrato se forma, um produto é formado, a enzima modificada forma um segundo complexo com uma molécula de um outro substrato, e um segundo produto é formado, regenerando a enzima livre. O substrato 1 pode transferir um grupo funcional para a enzima (originando a forma modificada covalentemente, E'), que é subseqüentemente transferida para o substrato 2. Esse é o mecanismo chamado pingue-pongue ou de dupla-troca.

A cinética de estado pré-estacionário pode fornecer evidências para etapas específicas da reação

A cinética enzimática foi introduzida como um método importante para estudar as etapas de uma reação enzimática, bem como foram mencionadas as limitações dos parâmetros cinéticos mais comuns que fornecem tal informação. Os dois parâmetros experimentais mais importantes fornecidos pela cinética de estado estacionário são o k_{cat} e o k_{cat}/K_m. As variações desses parâmetros com a variação do pH e da temperatura podem fornecer informações adicionais a respeito das etapas de uma reação. No caso de reações com dois substratos, a cinética do estado estacionário pode ajudar a determinar se durante a reação é formado um complexo ternário (Fig. 8-14). Um quadro mais completo geralmente requer métodos cinéticos mais sofisticados, que vão além dos objetivos de um texto introdutório. Assim, será introduzida, de forma muito breve, uma das mais importantes abordagens para se estudar o mecanismo de uma reação, a cinética de estado pré-estacionário.

Tabela 8-8 – Enzimas nas quais o valor de k_{cat}/K_m está próximo do limite controlado pela difusão (de 10^8 a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$)

Enzima	Substrato	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Acetilcolinesterase	Acetilcolina	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	CO_2	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1,1	4×10^7
Crotonase	Crotonil CoA	$5,7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
β-Lactamase	Benzilpenicilina	$2,0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

Fonte: Fersht, A (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166. Freeman and Company, NewYork.

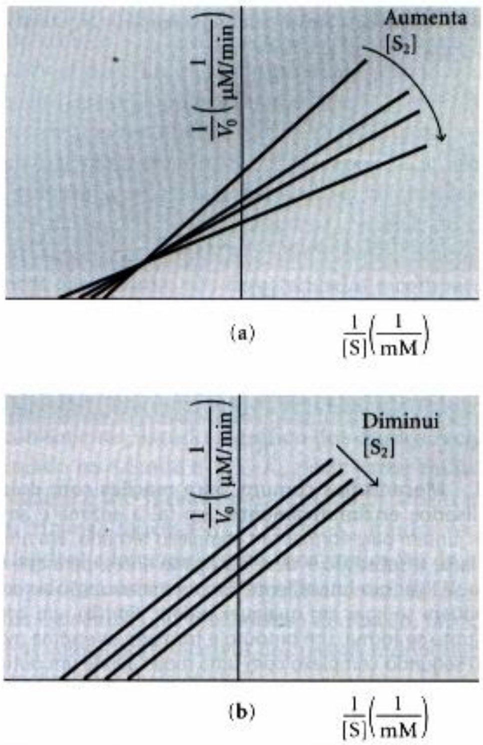


Figura 8-14 – Análise cinética do estado estacionário para reações com dois substratos. Nestes gráficos dos duplos recíprocos (veja Adendo 8-1), a concentração do substrato 1 é variável, enquanto a concentração do substrato 2 é mantida constante. Isso é repetido para vários valores de $[S_2]$, gerando várias retas separadas. A interseção dessas retas indica a formação de um complexo ternário na reação (**a**); retas paralelas indicam que a reação ocorre por uma via do tipo pingue-pongue ou dupla-troca (**b**).

Uma descrição completa de uma reação catalisada por enzimas requer medidas diretas das velocidades das etapas individuais da reação, como por exemplo a medida da associação da enzima e com o substrato para formar o complexo ES. É durante o estado pré-estacionário que as velocidades de muitas etapas da reação podem ser medidas independentemente. As condições da reação são ajustadas para facilitar a medida dos eventos que ocorrem durante a transformação de uma única molécula de substrato. Uma vez que a fase de estado pré-estacionário em geral é muito curta, freqüentemente são necessárias técnicas especializadas para efetuar uma mistura muito rápida dos reagentes e a amostragem que se segue. Um dos objetivos é a obtenção de um quadro completo e quantitativo das mudanças de energia durante a reação. Conforme mencionado anteriormente, a velocidade das reações e o equilíbrio estão relacionados com as mudanças de energia livre que ocorrem durante a reação. A medida da velocidade das etapas individuais de uma reação revela como a energia é usada por uma enzima específica, o que representa um componente importante do mecanismo global da reação. Em um grande número de casos já é possível medir a velocidade de cada uma das etapas individuais de uma reação enzimática que apresenta várias etapas. Alguns exemplos da aplicação da cinética de estado pré-estacionário estão incluídos nas descrições de enzimas específicas, ainda neste capítulo.

As enzimas são sujeitas à inibição

Os inibidores das enzimas são agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos celulares e não é surpreendente que os inibidores das enzimas estejam entre os mais importantes agentes farmacêuticos conhecidos. Por exemplo, a aspirina (acetilsalicilato) inibe a enzima que catalisa o primeiro passo na síntese das prostaglandinas, compostos envolvidos em muitos processos, incluindo alguns que produzem a sensação de dor. O estudo dos inibidores das enzimas tem fornecido valiosas informações a respeito dos mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir algumas vias metabólicas. Existem duas grandes classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis.

A inibição reversível pode ser competitiva, incompetitiva ou mista

Um tipo comum de **inibidor reversível** é chamado **competitivo** (Fig. 8-15a). Um **inibidor competitivo** compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto o inibidor (I) ocupar o

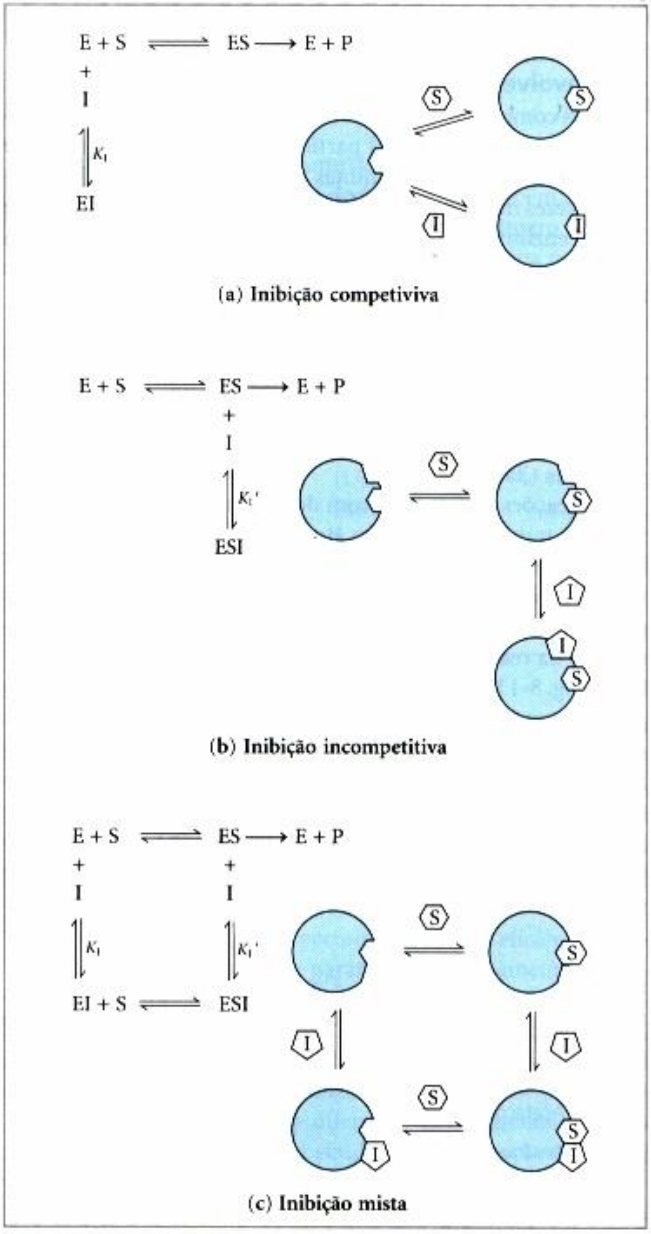


Figura 8-15 – Três tipos de inibição reversível. (**a**) Os inibidores competitivos se ligam ao centro ativo da enzima. (**b**) Os inibidores incompetitivos se ligam em regiões diferentes do sítio ativo, mas se ligam apenas ao complexo ES. K_I é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor à enzima, enquanto K_I' é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor ao complexo ES. (**c**) Os inibidores mistos se ligam em regiões diferentes do sítio ativo, mas podem se ligar tanto a E como a ES.

centro ativo da enzima, ele impedirá a ligação do substrato. Os inibidores competitivos são compostos cujas estruturas moleculares freqüentemente lembram a do substrato e que se combinam com a enzima para formar um complexo EI, sem contudo propiciar a catálise. Até mesmo associações rápidas desse tipo afetarão negativamente a eficiência da enzima. Levando-se em consideração a geometria molecular do inibidor, que é parecida com a do substrato, é possível obter conclusões sobre quais partes do substrato normal se ligam à enzima. A inibição competitiva pode ser analisada quantitativamente pela cinética de estado estacionário. Na presença de um inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten (Eq. 8-28) fica:

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{\alpha K_m + [S]} \tag{8-28}$$

onde

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

e

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

A Equação 8-28 descreve as características importantes da inibição competitiva. O termo αK_m (K_m observado na presença do inibidor), determinado experimentalmente, é freqüentemente denominado K_m "aparente".

Como o inibidor se liga reversivelmente à enzima, a competição pode se tornar favorável ao substrato pela adição de mais substrato. Quando a [S] é muito maior que a [I], a probabilidade de uma molécula do inibidor se ligar à enzima será mínima e a reação exibirá uma $V_{\text{máx}}$ normal. Entretanto, a [S] em que $V_0 = \frac{1}{2} V_{\text{máx}}$, o K_m aparente, estará aumentada de um fator α na presença do inibidor. Esse efeito no K_m aparente, combinado com a ausência de um efeito em $V_{\text{máx}}$, é diagnóstico da inibição competitiva e facilmente revelado no gráfico dos duplos recíprocos (Adendo 8-2). A constante de equilíbrio para a ligação do inibidor, K_I, pode ser obtida a partir do mesmo gráfico.

Uma terapêutica baseada na competição pelo centro ativo é usada para tratar pacientes que ingeriram metanol, um solvente encontrado em misturas anticongelantes. A desidrogenase alcoólica do fígado converte o metanol em formaldeído, que é prejudicial à maioria dos tecidos. A cegueira é um resultado freqüente da intoxicação pelo metanol, porque os olhos são particularmente sensíveis ao formaldeído. O etanol compete efetivamente com o metanol como um substrato alternativo para a desidrogenase alcoólica. O efeito do etanol é muito parecido com o de um inibidor competitivo, com a ressalva de que o etanol também é um substrato e a sua concentração diminui com o decorrer do tempo, à medida que a enzima o converte em acetaldeído. Assim, a terapia para o envenenamento com metanol é a infusão endovenosa gradual de etanol, em uma velocidade que mantenha uma concentração controlada na corrente sangüínea durante várias horas. Isso diminui a formação do formaldeído, reduzindo o perigo, enquanto os rins excretam o metanol pela urina sem maiores danos.

As duas outras formas de inibição reversível, incompetitiva e mista, são freqüentemente definidas em termos de enzimas com um único substrato, mas na prática têm sido observadas apenas com enzimas que têm dois ou mais substratos. Um **inibidor incompetitivo** (Fig. 8-15b) se liga em um sítio diferente do sítio ativo do substrato, porém, diferentemente do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo ES.

Na presença de um inibidor incompetitivo, a equação de Michaelis-Menten se altera para

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \tag{8-29}$$

onde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$$

e

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Conforme descrito pela Equação 8-29, em altas concentrações do substrato, V_0 se aproxima de $V_{\text{máx}}/\alpha'$. Assim, um inibidor incompetitivo diminui a $V_{\text{máx}}$. O valor do K_m aparente também diminui porque a [S] requerida para alcançar a metade da $V_{\text{máx}}$ diminui de um fator α'.

Um **inibidor misto** (Fig. 8-15c) também se liga a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, mas ele pode se ligar tanto a E como a ES. A equação que descreve a inibição mista é

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \tag{8-30}$$

onde α e α' são definidos como anteriormente. Um inibidor misto geralmente afeta tanto o K_m como a $V_{\text{máx}}$. O caso especial em que $\alpha = \alpha'$, raramente encontrado na prática, é definido classicamente como **inibição não-competitiva**. Analise a Equação 9-30 para perceber por que um inibidor não competitivo afeta a $V_{\text{máx}}$, mas não o K_m.

Na prática, as inibições incompetitiva e mista são observadas somente para enzimas com dois ou mais substratos (por exemplo, S_1 e S_2), e esses substratos são muito importantes na análise experimental de tais enzimas. Se um inibidor se liga ao sítio ocupado por S_1, ele pode atuar como um inibidor competitivo em experimentos nos quais a $[S_1]$ é variável. Se um inibidor se liga ao sítio normalmente ocupado por S_2, ele pode atuar como um inibidor misto ou como um inibidor incompetitivo de S_1. Os modelos de inibição atualmente observados dependem do fato de as ligações de S_1 e S_2 serem ordenadas ou ao acaso. Desse modo, pode-se determinar a ordem com que esses substratos se ligam ao sítio ativo e os produtos são liberados. Freqüentemente, o uso de um dos produtos da reação como um inibidor é particularmente informativo. Se somente um dos dois produtos da reação estiver presente, então a reação inversa não ocorrerá. Contudo, um produto geralmente se ligará em alguma parte do sítio ativo atuando como um inibidor. Os estudos de inibição geralmente são elaborados e podem proporcionar uma descrição detalhada do mecanismo de uma reação bissubstrato.

A inibição irreversível é uma ferramenta importante na pesquisa das enzimas e em farmacologia

Inibidores irreversíveis são aqueles que se combinam com um grupo funcional na molécula da enzima ou o destroem ou ainda formam uma associação covalente bastante estável. A formação de uma ligação covalente entre o inibidor e a enzima é muito comum. Os inibidores irreversíveis representam uma ferramenta muito útil no estudo do mecanismo das reações. Os aminoácidos essenciais do sítio ativo que apresentam funções catalíticas importantes freqüentemente são identificados por meio da determinação do aminoácido que está ligado covalentemente ao inibidor depois que a enzima é inativada. Um exemplo está mostrado na Figura 8-16.

Uma classe especial de inibidores irreversíveis é a dos **inibidores suicidas**. Esses compostos são relativamente pouco reativos até se ligarem ao sítio ativo de uma enzima específica. Um

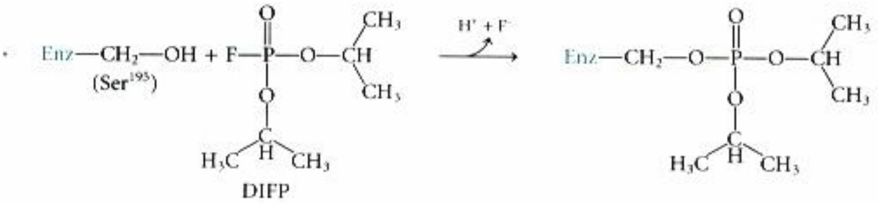


Figura 8-16 – Inibição irreversível. A reação da quimotripsina com o diisopropilfluorfosfato (DIFP) inibe irreversivelmente a enzima. Isso levou à conclusão de que a Ser^{195} é o resíduo-chave de serina do sítio ativo da quimotripsina.

Adendo 8-2 Testes cinéticos para a determinação dos mecanismos de inibição

O gráfico dos duplos recíprocos (veja Adendo 8-1) oferece uma forma fácil de determinar se um inibidor enzimático é competitivo, incompetitivo ou misto. Dois conjuntos de experimentos de determinação de velocidade devem ser realizados e, em ambos os conjuntos, a concentração da enzima é mantida constante. No primeiro conjunto, a [S] também é mantida constante, permitindo a medida do efeito do aumento da concentração do inibidor [I] na velocidade inicial V_0 (não mostrado). No segundo conjunto, a [I] é mantida constante, mas a [S] varia. Os resultados são lançados em gráfico na forma de $1/V_0$ *versus* $1/[S]$.

A Figura 1 mostra um conjunto de gráficos dos duplos recíprocos, um deles obtido na ausência do inibidor e dois outros obtidos em duas concentrações diferentes de um inibidor competitivo. O aumento da [I] resulta em uma família de retas com intercepto comum no eixo $1/V_0$ mas com inclinações diferentes. Como o intercepto no eixo $1/V_0$ é igual a $1/V_{máx}$, observa-se que a $V_{máx}$ permanece inalterada na presença de um inibidor competitivo. Isto é, independentemente da concentração de um inibidor competitivo, uma concentração suficientemente alta do substrato sempre deslocará o inibidor competitivo do sítio ativo da enzima. Acima do gráfico está mostrado o rearranjo da Equação 8-28, na qual o gráfico é baseado. O valor de α pode ser calculado pela mudança da inclinação para uma dada [I]. Conhecendo-se a [I] e α, é possível determinar K_I por meio da expressão:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

Para uma inibição incompetitiva e mista, gráficos similares dos valores de velocidade originam as famílias de retas mostradas nas Figuras 2 e 3. Mudanças nos interceptos dos eixos assinalam mudanças em $V_{máx}$ e K_m.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{máx}}$$

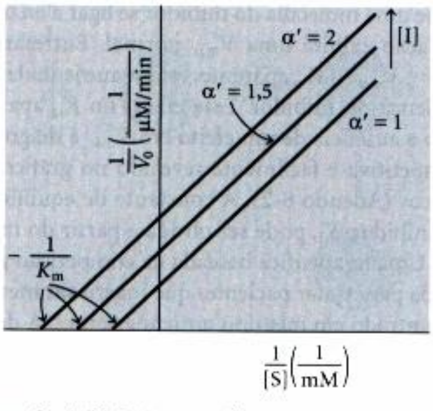


Figura 2 – Inibição incompetitiva.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

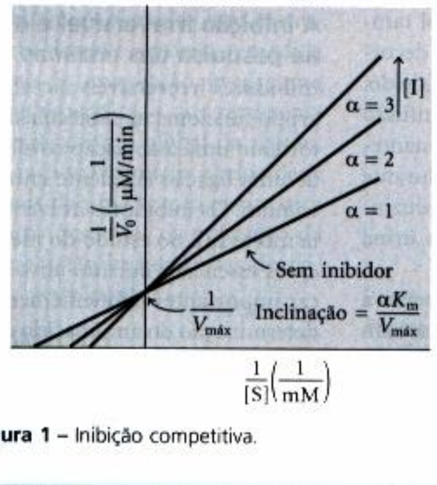


Figura 1 – Inibição competitiva.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{máx}}$$

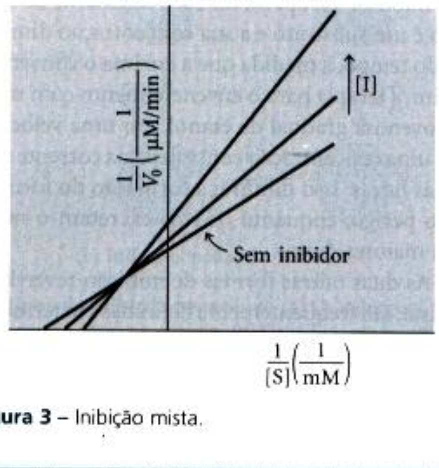


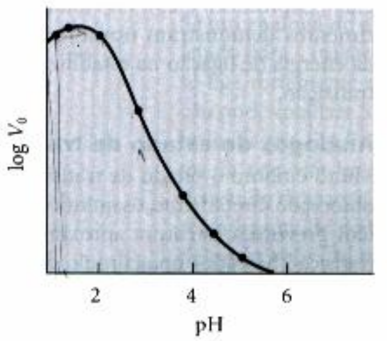
Figura 3 – Inibição mista.

inibidor suicida é desenhado para participar dos primeiros passos químicos da reação enzimática normal. Entretanto, em vez de ser transformado no produto normal, o inibidor é convertido em um composto muito reativo que se combina irreversivelmente com a enzima. Esses compostos também são chamados de **inibidores com base no mecanismo**, porque eles utilizam o mecanismo da reação enzimática normal para inativar a enzima. Esses inibidores ocupam um papel central no desenvolvimento racional de drogas, uma abordagem moderna para a obtenção de novos agentes farmacêuticos, em que novos substratos são sintetizados baseando-se no conhecimento dos substratos já conhecidos e nos mecanismos das reações. Um inibidor suicida bem planejado é específico para uma única enzima e não é reativo até que esteja dentro do sítio ativo da enzima. Assim, as drogas baseadas nessa estratégia oferecem a grande vantagem de apresentar poucos efeitos colaterais (veja Adendo 22-2).

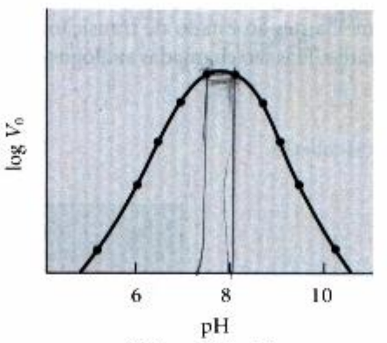
A atividade enzimática é afetada pelo pH

As enzimas têm um pH ótimo (ou um intervalo de pH) no qual a sua atividade é máxima (Fig. 8-17). Em um pH maior ou menor, a atividade diminui. Isso não é surpreendente. As cadeias laterais dos aminoácidos do centro ativo podem atuar como ácidos e bases fracas com funções críticas que dependem da manutenção de certos estados de ionização e, em algum lugar da proteína, as cadeias laterais ionizadas podem desempenhar um papel essencial nas interações que mantêm a estrutura da proteína. Por exemplo, a remoção de um próton de um resíduo de His fora do centro ativo pode eliminar uma interação iônica essencial para a estabilização da conformação ativa da enzima. Uma causa menos comum de sensibilidade ao pH é a titulação de grupos do substrato.

O intervalo de pH no qual a enzima sofre mudanças na atividade pode fornecer uma pista sobre qual aminoácido está envolvido (veja Tabela 5-1). Uma mudança na atividade enzimática ao redor de pH 7,0, por exemplo, em geral reflete a titulação de um resíduo His. Entretanto, os efeitos do pH precisam ser interpretados com certa cautela. No ambiente bem empacotado de uma proteína, o pK_a da cadeia lateral de um aminoácido pode variar significativamente. Por exemplo, uma carga positiva vizinha pode diminuir o valor do pK_a de um resíduo de lisina, enquanto uma carga negativa vizinha pode aumentá-lo. Algumas vezes, esses efeitos resultam em um pK_a deslocado de duas ou mais unidades de pH em relação ao seu valor normal (do aminoácido livre). Na enzima acetoacetato descarboxilase, um resíduo Lis (pK_a normal 10,5) apresenta um pK_a de 6,6 devido a efeitos eletrostáticos de cargas positivas próximas.



Pepsina
(a)



Glicose-6-fosfatase
(b)

Figura 8-17 – O perfil pH-atividade de duas enzimas. Estas curvas são construídas com resultados de medidas das velocidades iniciais, quando a reação é desenvolvida em tampões com diferentes pH. Como o eixo do pH é uma escala logarítmica que reflete mudanças da ordem de 10 vezes nas concentrações de H^+, as mudanças em V_0 também são lançadas em uma escala logarítmica. O pH ótimo para a atividade de uma enzima geralmente reflete o ambiente onde a enzima é normalmente encontrada. **(a)** A pepsina que hidrolisa certas ligações peptídicas das proteínas durante a digestão no estômago tem pH ótimo, de cerca de 1,6. O pH do suco gástrico é da ordem de 1 a 2. **(b)** A glicose-6-fosfatase dos hepatócitos (células do fígado) com pH ótimo de cerca de 7,8 é responsável pela liberação da glicose no sangue. O pH normal do citosol dos hepatócitos é cerca de 7,2.

Exemplos de Reações Enzimáticas

Este capítulo focalizou até agora os princípios gerais da catálise e introduziu alguns parâmetros cinéticos empregados para descrever a ação das enzimas. Os princípios e os conhecimentos cinéticos estão combinados na Adendo 8-3 que descreve algumas das evidências que indicam que a energia de ligação e a complementaridade do estado de transição são pontos centrais para a catálise enzimática. Vamos examinar agora vários exemplos específicos de reação enzimática.

A compreensão do mecanismo de ação completo de uma enzima purificada requer a identificação de todos os substratos, co-fatores, produtos e reguladores. Além disso, ela requer o conhecimento de: (1) seqüência temporal da ligação das formas intermediárias da reação à enzima, (2) estrutura de cada intermediário e cada estado de transição, (3) velocidade de interconversão dos intermediários, (4) relação estrutural da enzima com cada intermediário, e (5) energia de todos os grupos reagentes e que interagem e contribuem para a formação dos intermediários e estados de transição. Provavelmente não existe nenhuma enzima de que nosso conhecimento atual satisfaça completamente esses requisitos. Não obstante a isso, várias décadas de pesquisa produziram informações mecanísticas a respeito de centenas de enzimas e, em alguns casos, essa informação é altamente detalhada.

O mecanismo das reações ilustra princípios

Apresentamos aqui os mecanismos da quimotripsina, hexoquinase e enolase. Essas enzimas foram escolhidas não por serem as mais bem conhecidas ou por abrangerem todas as classes possíveis da química de enzimática, mas porque ilustram claramente alguns princípios gerais explicados neste capítulo. A discussão está concentrada em princípios selecionados juntamente com alguns experimentos cruciais que ajudaram a chamar a atenção sobre esses princípios. Muitos detalhes mecanísticos e evidências experimentais foram omitidos e, em nenhum caso, os mecanismos descritos fornecem uma completa explicação para os aumentos da velocidade catalítica provocada por essas enzimas.

Adendo 8-3

Evidências da complementaridade entre a enzima e o estado de transição

O estado de transição de uma reação é difícil de ser estudado porque ele tem um tempo curto de vida. Entretanto, para entender a catálise enzimática é preciso analisar a interação entre a enzima e esse momento efêmero durante a reação. A complementaridade entre a enzima e o estado de transição é virtualmente um requisito para a catálise, já que a colina de energia sobre a qual o estado de transição se situa é que a enzima precisa diminuir, se a catálise ocorrer. Como podem ser obtidas evidências para a complementaridade entre a enzima e o estado de transição? Felizmente existe uma variedade de abordagens novas e antigas para resolver esse problema, cada uma delas fornecendo evidências muito convincentes em apoio a esse princípio geral da catálise enzimática.

Correlações estrutura-atividade

Se as enzimas são complementares aos estados de transição da reação, então alguns grupos funcionais do substrato e da enzima precisam interagir preferencialmente no estado de transição que no complexo ES. A alteração desses grupos deve provocar pouco efeito na formação do complexo ES e, portanto, não deve afetar os parâmetros cinéticos (a constante de dissociação, K_d, ou algumas vezes o K_m, se $K_d = K_m$) que refletem o equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$. Entretanto, mudanças desses mesmos grupos devem provocar um grande efeito na velocidade global (k_{cat} ou k_{cat}/K_m) da reação, uma vez que o substrato não apresenta as interações de ligação necessárias para diminuir a energia de ativação.

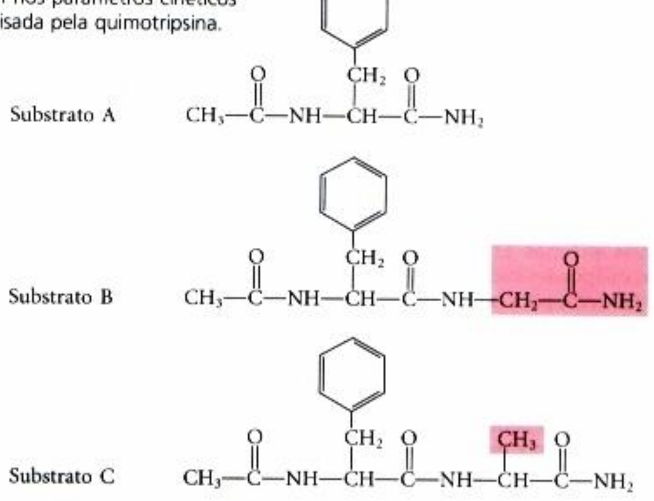
Um excelente exemplo desse efeito é mostrado na cinética associada a uma série de substratos similares para a quimotripsina (Fig. 1). A quimotripsina normalmente catalisa a hidrólise das ligações peptídicas adjacentes a aminoácidos aromáticos. Os substratos mostrados na Figura 1 são modelos menores, convenientes para os substratos naturais (polipeptídeos longos e proteínas; veja Capítulo 5). Os grupos químicos funcionais adicionados a cada substrato (A para B para C) estão sombreados em vermelho. Conforme mostrado na tabela da Figura 1, a interação entre a enzima e esses grupos funcionais adicionados provoca um efeito mínimo sobre o K_m (assumido como uma imagem de K_d), porém um grande efeito positivo sobre k_{cat} ou k_{cat}/K_m. Isso é o que esperaríamos se a interação contribuísse significativamente para a estabilização do estado de transição. Os resultados também mostram que a velocidade da reação pode ser afetada significativamente pelas interações enzima-substrato que, fisicamente, estão longe das ligações covalentes que serão alteradas na reação enzimática. A quimotripsina é descrita em maiores detalhes mais adiante.

Uma abordagem experimental complementar é modificar a enzima, eliminando certas interações enzima-substrato pela substituição de aminoácidos específicos por meio de mutagênese sítio-dirigida (Capítulos 6 e 29). Os resultados desses experimentos demonstram novamente a importância da energia de ligação na estabilização do estado de transição.

Análogos do estado de transição

Muito embora o estado de transição não possa ser observado diretamente, os químicos freqüentemente têm previsto a estrutura aproximada do estado de transição baseados no acúmulo de conhecimento a respeito dos mecanismos de reação. O estado de transição, por definição, é transiente e tão instável que medidas diretas da interação de ligação entre essas espécies e a enzima são impossíveis. Entretanto, em alguns casos, moléculas estáveis muito semelhantes ao estado de transição podem ser projetadas. Elas são chamadas **análogos do estado de tran-**

Figura 1 – Efeitos que pequenas mudanças estruturais na molécula do substrato provocam nos parâmetros cinéticos da hidrólise de uma amida catalisada pela quimotripsina.


Substrato A
CH₃—C(=O)—NH—CH(CH₂—C₆H₅)—C(=O)—NH₂
Substrato B
CH₃—C(=O)—NH—CH(CH₂—C₆H₅)—C(=O)—NH—CH₂—C(=O)—NH₂
Substrato C
CH₃—C(=O)—NH—CH(CH₂—C₆H₅)—C(=O)—NH—CH(CH₃)—C(=O)—NH₂

k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}\ s^{-1}$)
0,06	31	2
0,14	15	10
2,8	25	114

sição. Em princípio, elas devem se ligar a uma enzima mais firmemente do que o substrato no complexo ES, uma vez que elas devem se ajustar melhor ao sítio ativo (isto é, formar um maior número de interações fracas) que o próprio substrato. A idéia dos análogos do estado de transição foi sugerida por Pauling, na década de 1940, e tem sido averiguada para um certo número de enzimas. Esses experimentos têm a limitação de que um estado de transição análogo nunca pode mimetizar perfeitamente o estado de transição. Entretanto, alguns análogos se ligam à enzima 10^2 a 10^6 vezes mais firmemente que o próprio substrato normal, acarretando uma boa evidência de que os sítios ativos das enzimas são realmente complementares aos estados de transição. O mesmo princípio é atualmente usado, como rotina na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de novas drogas. As potentes drogas anti-HIV chamadas inibidores de proteases foram desenvolvidas como análogos que se ligam fortemente ao estado de transição e são direcionadas para o centro ativo da protease do HIV.

Anticorpos catalíticos

Se um análogo do estado de transição pode ser projetado para a reação $S \rightarrow P$, então um anticorpo que se liga fortemente ao análogo do estado de transição pode catalisar $S \rightarrow P$. Os anticorpos (imunoglobulinas; veja Fig. 7-23) são os principais participantes da resposta imunológica. Quando um análogo do estado de transição é empregado como uma proteína ligante de epitopo para estimular a produção de anticorpos, os anticorpos que se ligam a ele são catalisadores potenciais da reação correspondente. O uso de "anticorpos catalíticos" inicialmente sugerida por William P. Jencks, em 1969, tornou-se prático com o desenvolvimento de técnicas de laboratório para produzir anticorpos idênticos que se ligam a um único antígeno específico (anticorpos monoclonais, veja Capítulo 7).

Trabalhos pioneiros nos laboratórios de Richard Lerner e Peter Schultz resultaram no isolamento de alguns anticorpos monoclonais que catalisam a hidrólise de ésteres ou carbonatos (Fig. 2). Nessas reações, o ataque da água (OH^-) ao carbono da carbonila produz um estado de transição tetraédrico, no qual uma carga parcial negativa se desenvolve no oxigênio da carbonila. Os fosfonatos mimetizam a estrutura e a distribuição de cargas desse estado de transição durante a hidrólise de ésteres, tornando-os bons análogos do estado de transição. Por isso, os fosfonatos são usados nas reações de hidrólise de carbonatos. Os anticorpos que ligam fortemente o fosfonato ou o fosfato aceleram as reações de hidrólise do éster ou carbonato correspondentes, da ordem de 10^3 a 10^4. Análises estruturais de alguns desses anticorpos catalíticos mostraram que as cadeias laterais de alguns aminoácidos catalíticos estão arranjadas de tal modo que interagem com o substrato, principalmente quando ele se encontra no estado de transição.

Os anticorpos catalíticos geralmente não apresentam a mesma eficiência catalítica das enzimas; entretanto, eles estão começando a ser utilizados na indústria e em medicina. Por exemplo, os anticorpos catalíticos desenvolvidos para degradar a cocaína estão sendo pesquisados como auxílio importante no tratamento da dependência de cocaína.

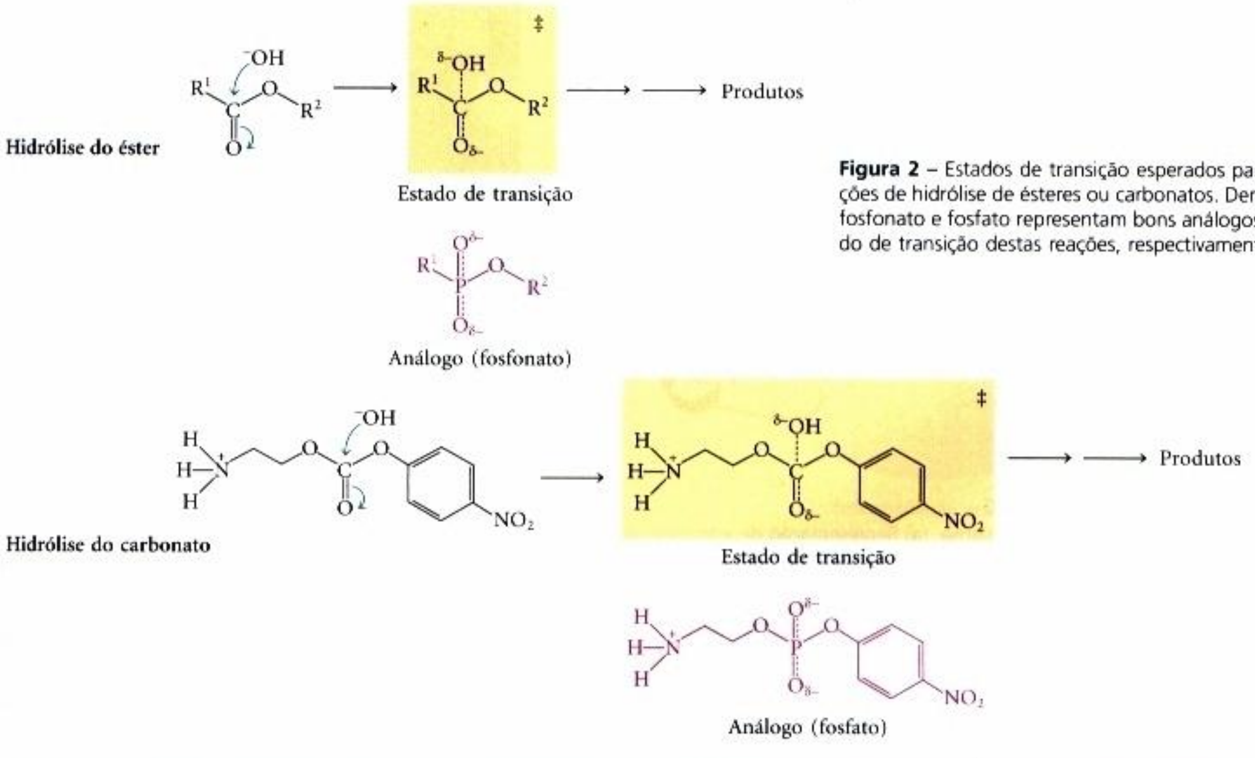


Figura 2 – Estados de transição esperados para as reações de hidrólise de ésteres ou carbonatos. Derivados de fosfonato e fosfato representam bons análogos do estado de transição destas reações, respectivamente.

Quimotripsina. A quimotripsina (M_r 25.000) é uma protease, uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. Essa protease é específica para quebrar ligações peptídicas adjacentes a resíduos de aminoácidos aromáticos (veja Tabela 5-7). A estrutura tridimensional da quimotripsina é mostrada na Figura 8-18, na qual estão enfatizados os grupos funcionais do sítio ativo. A reação catalisada por essa enzima ilustra o princípio da estabilização do estado de transição e também fornece um exemplo clássico de catálise ácido-base geral e catálise covalente.

A quimotripsina aumenta a velocidade de hidrólise da ligação peptídica de um fator de pelo menos 10^9. A enzima não catalisa o ataque direto da água sobre a ligação peptídica. Em vez disso, ocorre a formação de um intermediário covalente transiente, a acil-enzima. Desse modo, essa reação tem duas fases principais (Fig. 8-19). Na fase de acilação, a ligação peptídica é quebrada e uma ligação éster é formada entre o carbono da carbonila e a enzima. Na fase de desacilação, a ligação éster é hidrolisada e a enzima não-acilada é regenerada. Na fase de acilação o nucleófilo é o oxigênio da Ser^{195}. Normalmente, a hidroxila da serina está protonada em pH neutro, mas a Ser^{195} está ligada por ponte de hidrogênio à His^{57}, que também está ligada por ponte de hidrogênio ao Asp^{102}. Esses três aminoácidos são freqüentemente chamados de tríade catalítica. Quando o oxigênio da Ser^{195} ataca o carbono da carbonila da ligação peptídica, a His^{57}, que está ligada por pontes de hidrogênio, funciona como uma base geral removendo o próton da serina, enquanto o Asp^{102}, carregado negativamente, estabiliza a carga positiva que se forma no resíduo de His. Isso previne a formação de uma carga positiva muito instável na hidroxila da Ser^{195} e a torna muito mais nucleofílica. A His^{57} pode também agir como um doador de prótons e protonar o grupo amino na porção do substrato que foi deslocada (o grupo que sai). Um conjunto semelhante de transferências de prótons ocorre no passo de desacilação.

Enquanto o oxigênio da Ser^{195} ataca o grupo carbonila do substrato, é formado um intermediário de vida muito curta, no qual o oxigênio da carbonila adquire uma carga negativa. Essa carga é formada dentro de uma cavidade na enzima, chamada de fenda oxiânion, e estabilizada por pontes de hidrogênio proporcionadas pelos nitrogênios dos grupos amida de duas ligações peptídicas do esqueleto da quimotripsina. Uma dessas pontes de hidrogênio ocorre apenas nesse intermediário e nos estados de transição de sua formação e quebra, reduzindo assim a energia necessária para atingir esses estados. Este é um exemplo do uso da energia de ligação na catálise.

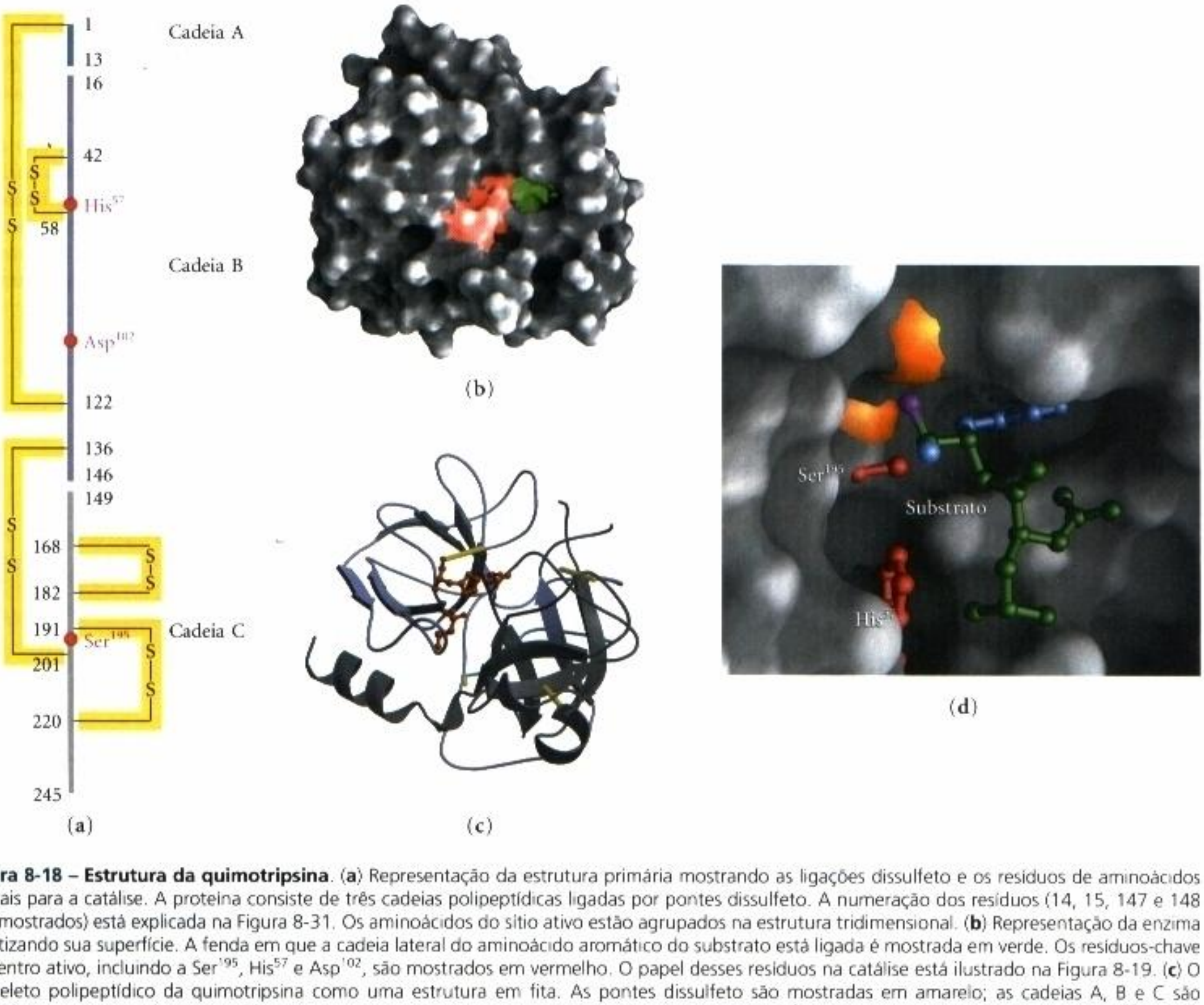


Figura 8-18 – Estrutura da quimotripsina. (**a**) Representação da estrutura primária mostrando as ligações dissulfeto e os resíduos de aminoácidos cruciais para a catálise. A proteína consiste de três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto. A numeração dos resíduos (14, 15, 147 e 148 não mostrados) está explicada na Figura 8-31. Os aminoácidos do sítio ativo estão agrupados na estrutura tridimensional. (**b**) Representação da enzima enfatizando sua superfície. A fenda em que a cadeia lateral do aminoácido aromático do substrato está ligada é mostrada em verde. Os resíduos-chave do centro ativo, incluindo a Ser^{195}, His^{57} e Asp^{102}, são mostrados em vermelho. O papel desses resíduos na catálise está ilustrado na Figura 8-19. (**c**) O esqueleto polipeptídico da quimotripsina como uma estrutura em fita. As pontes dissulfeto são mostradas em amarelo; as cadeias A, B e C são coloridas como mostradas em (**a**). (**d**) Uma vista completa do sítio ativo com o substrato (verde) ligado. Dois dos resíduos do centro ativo, Ser^{195} e His^{57}, (vermelho) são parcialmente visíveis. A Ser^{195} ataca o grupo carbonila do substrato (o oxigênio é mostrado em púrpura) e a carga negativa que se desenvolve no oxigênio é estabilizada pela cavidade oxiânion (nitrogênios da ligação amida mostrados em alaranjado), conforme explicado na Figura 8-19. No substrato, a cadeia lateral do aminoácido aromático e o nitrogênio amida da ligação peptídica que será quebrada (projetando-se na direção do leitor e projetando a trajetória do resto da cadeia polipeptídica do substrato) estão mostrados em azul.

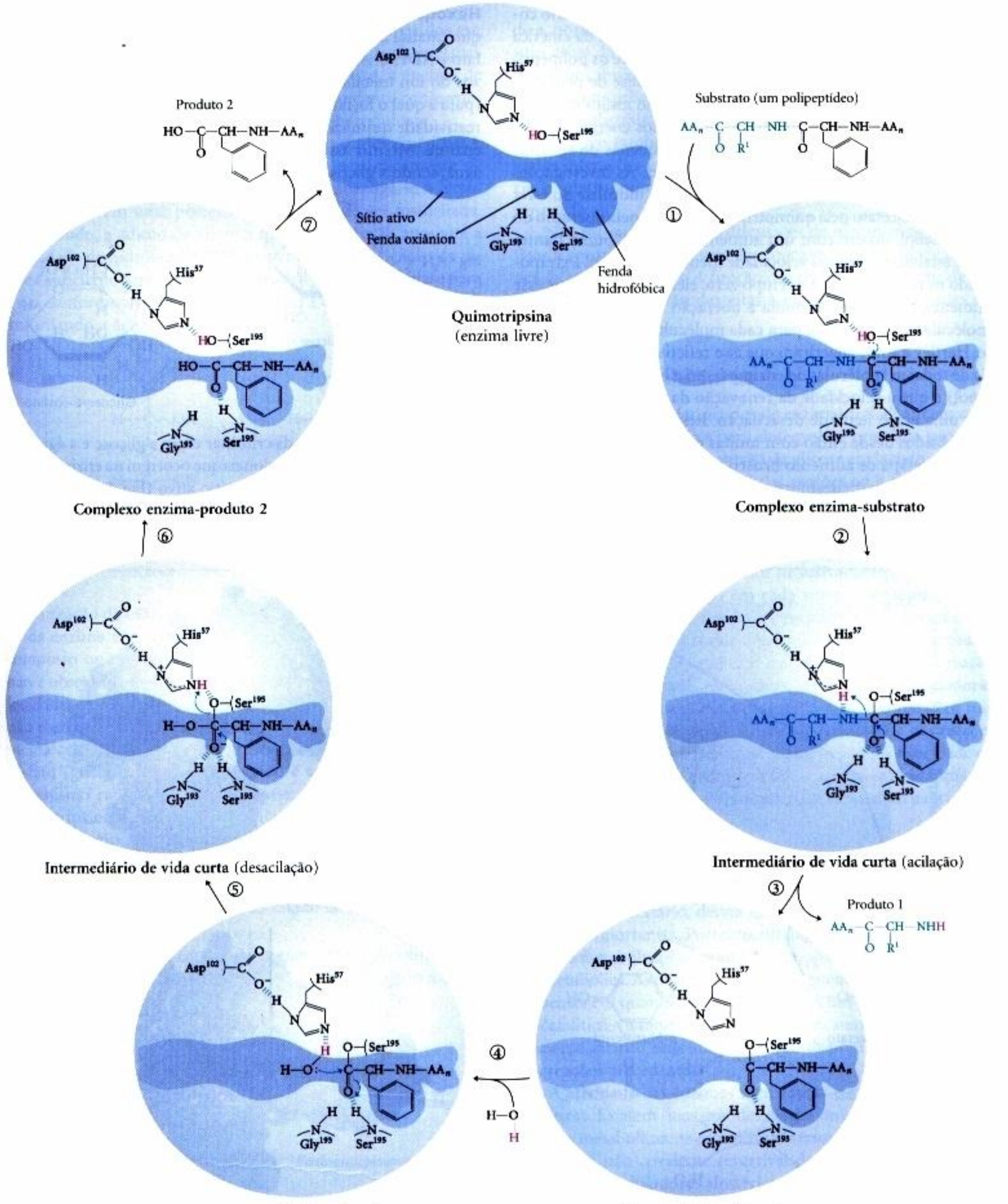
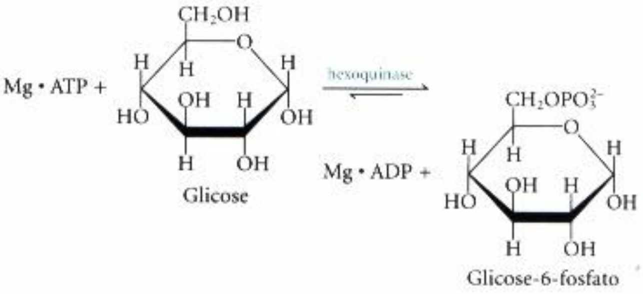

Quimotripsina
(enzima livre)
Sítio ativo
Fenda oxiânion
Fenda hidrofóbica
Substrato (um polipeptídeo)
①
Complexo enzima-substrato
②
Intermediário de vida curta (acilação)
③
Produto 1
Intermediário acil-enzima
④
H–O–H
Intermediário acil-enzima
⑤
Intermediário de vida curta (desacilação)
⑥
Complexo enzima-produto 2
⑦
Produto 2
Asp¹⁰²
His⁵⁷
Ser¹⁹⁵
Gly¹⁹³
AAₙ

Figura 8-19 – Passos na hidrólise de uma ligação peptídica pela quimotripsina. O substrato (um polipeptídeo ou proteína) está ligado no sítio ativo. A ligação peptídica a ser quebrada é posicionada pela ligação da cadeia lateral do aminoácido hidrofóbico adjacente (um resíduo de fenilalanina, neste exemplo) em uma fenda hidrofóbica especial na enzima. A reação consiste de duas fases. Nas etapas ① a ③, a formação do intermediário covalente acil-enzima está associada à hidrólise da ligação peptídica (fase de acilação). Nas etapas ④ a ⑦, a desacilação regenera a enzima livre (fase de desacilação). Em ambas as fases, o oxigênio da carbonila do substrato adquire uma carga negativa no intermediário tetraédrico. A carga é estabilizada por pontes de hidrogênio entre os nitrogênios amida da Gli^{193} e da Ser^{195}. A ponte de hidrogênio com a Gli^{193} é formada apenas nesse intermediário de curta duração e nos estados de transição que levam à sua formação e decomposição. A desacilação é essencialmente o reverso da acilação, em que a água é usada em substituição ao grupo amino do substrato. Os resíduos de His e Asp cooperam na tríade catalítica proporcionando uma catálise básica geral nas etapas ② e ⑤ e uma catálise ácida geral nas etapas ③ e ⑦.

A primeira evidência da existência de um intermediário covalente acil-enzima surgiu de uma aplicação clássica da cinética de estado pré-estacionário. Além da sua ação sobre os polipeptídeos, a quimotripsina também catalisa a hidrólise de pequenas moléculas de amidas e ésteres. Essas reações são muito mais lentas que a hidrólise de peptídeos porque menos energia de ligação está disponível com essas moléculas pequenas de substratos, mas elas são mais fáceis de ser estudadas. As investigações de B.S. Hartley e B.A. Kilby mostraram que a hidrólise do éster *p*-nitrofenilacetato pela quimotripsina, medida pela liberação do *p*-nitrofenol, ocorre com um aumento brusco ("burst") antes de se estabilizar em uma velocidade menor (Fig. 8-20). Extrapolando os resultados para o tempo zero, eles concluíram que esse aumento brusco correspondia à liberação de exatamente uma molécula de *p*-nitrofenol para cada molécula de enzima presente. Hartley e Kilby sugeriram que isso refletia uma acilação rápida de todas as moléculas de enzima (com a liberação de *p*-nitrofenol) e que a velocidade da renovação da enzima era limitada por uma etapa lenta de desacilação. Resultados similares têm sido obtidos desde então com muitas outras enzimas. A observação da etapa de aumento brusco constitui outro exemplo do uso da cinética para decompor uma reação em suas etapas constituintes.

Hexoquinase. Esta é uma enzima bissubstrato (M_r 100.000) que catalisa a interconversão de glicose e ATP em glicose-6-fosfato e ADP. O ATP e o ADP ligam-se às enzimas como complexos do íon metálico Mg^{2+}. A hidroxila do carbono 6 da glicose (para a qual o fosfato γ do ATP é transferido) é similar à água em reatividade química, e a água entra livremente no sítio ativo da enzima. Mesmo assim, a hexoquinase discrimina a glicose da água, sendo a glicose favorecida por um fator de 10^6.



A hexoquinase pode discriminar entre a glicose e a água devido às mudanças conformacionais que ocorrem na enzima quando o substrato correto se liga ao sítio ativo (Fig. 8-21). Assim, a hexoquinase representa um excelente exemplo de ajuste induzido.

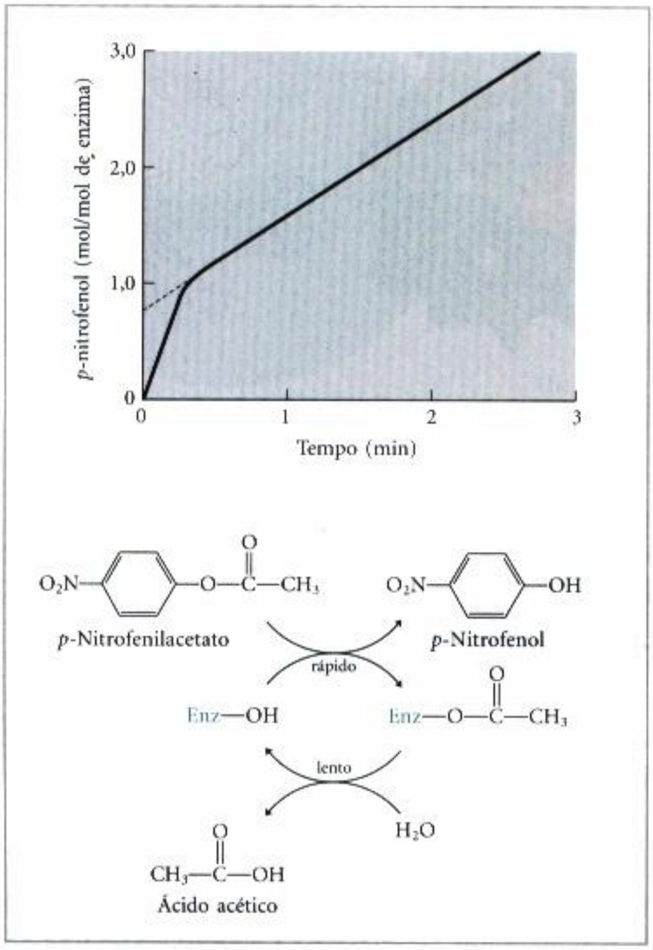


Figura 8-20 – A cinética de estado pré-estacionário evidencia um intermediário acil-enzima. A hidrólise do *p*-nitrofenilacetato pela quimotripsina é medida pela liberação de *p*-nitrofenol (um produto colorido). Inicialmente, uma quantidade de *p*-nitrofenol quase estequiométrica com a quantidade de enzima presente é liberada por meio de um aumento rápido. Isso reflete a fase rápida de acilação da reação. A velocidade subseqüente é menor, uma vez que a renovação da enzima é limitada pela velocidade da fase de desacilação, mais lenta.

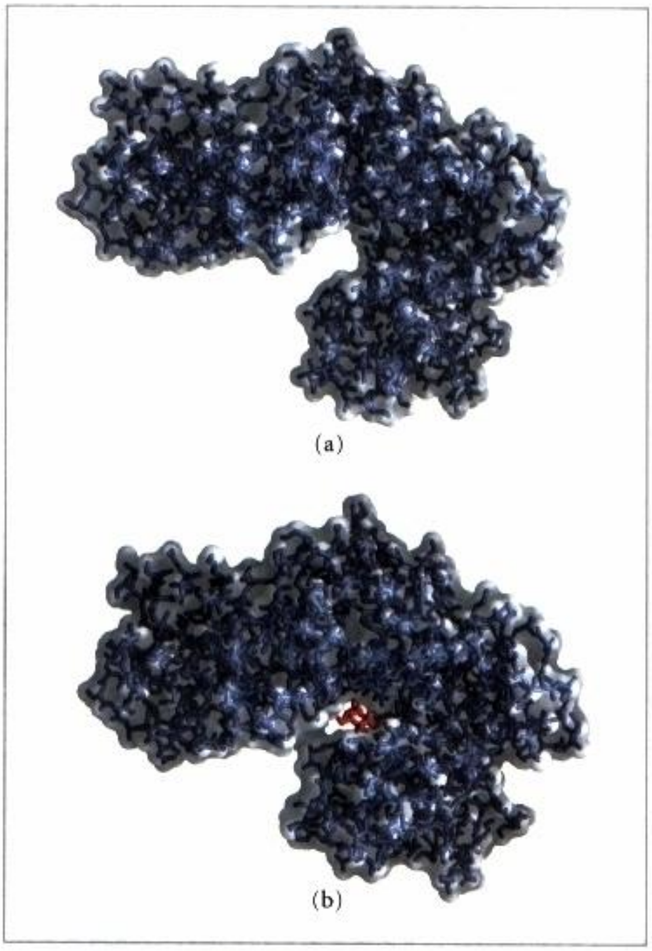
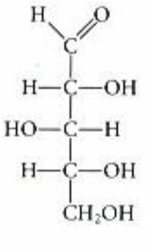
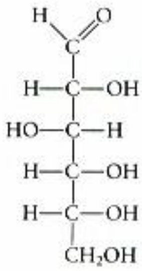


Figura 8-21 – Ajuste induzido na hexoquinase. As extremidades da hexoquinase, uma enzima em forma de U (**a**), atuam como pinça devido a uma mudança conformacional induzida pela ligação da D-glicose (vermelho) (**b**).

Quando a glicose não está presente, a enzima está em uma conformação inativa, com as cadeias laterais dos aminoácidos em uma posição inadequada para a reação. Quando a glicose (mas não a água) e o ATP · Mg se ligam ao sítio ativo, a energia de ligação derivada dessa interação induz uma mudança conformacional para a forma cataliticamente ativa da hexoquinase.

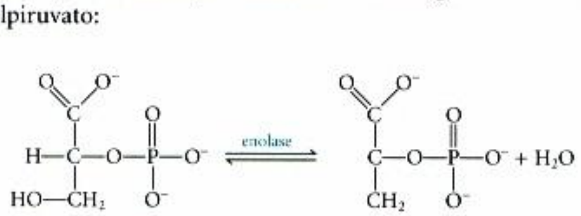
Essa conclusão tem sido reforçada por estudos cinéticos. A xilose, um açúcar de cinco carbonos, estereoquimicamente similar à glicose mas com um carbono a menos, liga-se à hexoquinase mas em uma posição onde não pode ser fosforilada. Desse modo, a adição de xilose à mistura de reação aumenta a velocidade de hidrólise do ATP. Evidentemente, a ligação da xilose é suficiente para induzir uma mudança na hexoquinase para a sua conformação ativa e, desse modo, a enzima é "enganada", fosforilando a água.


Xilose


Glicose

A reação da hexoquinase também ilustra que a especificidade da enzima não é apenas um simples caso de ligação de um composto ou outro. No caso da hexoquinase, a especificidade não é observada na formação do complexo ES, mas sim nas velocidades relativas das etapas catalíticas subseqüentes. A água não é excluída do centro ativo, mas a velocidade da reação aumenta consideravelmente na presença de um grupo aceptor de fosfato (glicose). O ajuste induzido é apenas um aspecto do mecanismo catalítico da hexoquinase: do mesmo modo que a quimotripsina, a hexoquinase utiliza várias estratégias catalíticas. Por exemplo, os resíduos de aminoácidos do centro ativo (aqueles posicionados pelas mudanças conformacionais resultantes da ligação do substrato) participam de uma catálise ácido-base geral e da estabilização do estado de transição.

Enolase. Esta enzima catalisa uma etapa da via glicolítica (Capítulo 15), a desidratação reversível do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato:



2-Fosfoglicerato Fosfoenolpiruvato

A enolase de levedura (M_r 96.000) é um dímero com 436 resíduos de aminoácidos por subunidade. A reação da enolase ilustra um tipo de catálise por íon metálico e proporciona um exemplo adicional de catálise ácido-base geral e estabilização do estado de transição. A reação ocorre em duas etapas (Fig. 8-22a). O resíduo Lys^{345} atua como um catalisador básico geral, retirando um próton do carbono 2 do 2-fosfoglicerato na primeira etapa. O Glu^{211} atua como um catalisador ácido geral, doando um próton para o grupo —OH que é removido da molécula na segunda etapa.

O próton do carbono 2 do 2-fosfoglicerato não é muito ácido e, portanto, ele não é removido rapidamente. Entretanto, no sítio ativo da enzima, o 2-fosfoglicerato é submetido a fortes interações iônicas com dois íons Mg^{2+} ligados (Fig. 8-22b), o que torna o carbono 2 mais ácido (diminuindo seu pK_a) e mais fácil de se abstrair. A formação de pontes em outros resíduos do centro ativo também contribui para o mecanismo global. As várias interações estabilizam efetivamente tanto o intermediário enolato como o estado de transição que precede a sua formação.

Não foi incluída nestas discussões de mecanismos enzimáticos a contribuição especial das coenzimas na atividade catalítica de muitas enzimas. A função das coenzimas é quimicamente variada, e elas serão descritas à medida que constatadas na Parte III deste livro.

Enzimas Reguladoras

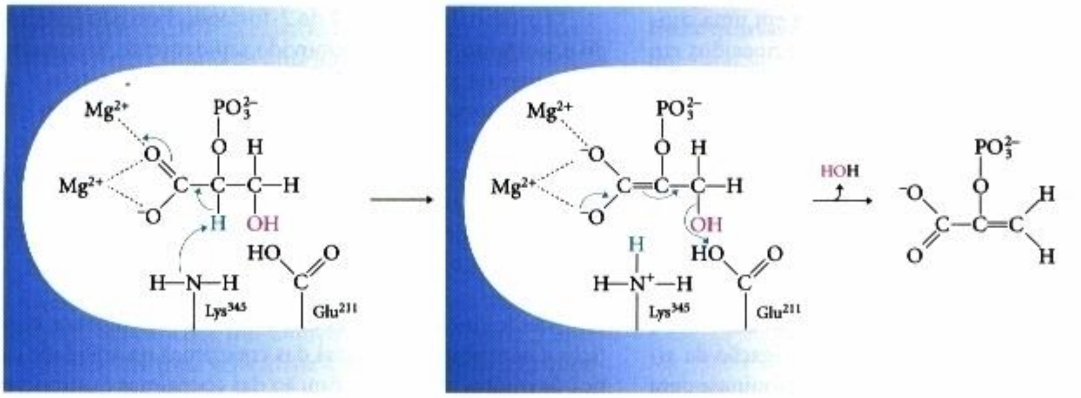
No metabolismo celular, grupos de enzimas trabalham em conjunto em vias seqüenciais para desenvolver um dado processo metabólico, tal como a conversão da glicose em lactato no músculo esquelético por meio de várias reações ou a síntese de um aminoácido a partir de precursores mais simples em uma célula bacteriana, por meio de várias reações. Nesses sistemas enzimáticos, o produto da reação da primeira enzima torna-se o substrato da próxima enzima, e assim sucessivamente.

A maioria das enzimas em cada sistema segue os padrões cinéticos já descritos. Entretanto, em cada via metabólica existe pelo menos uma enzima que determina a velocidade de toda a seqüência, porque ela catalisa a reação mais lenta ou a reação limitante da velocidade. Além disso, essas **enzimas reguladoras** têm sua atividade catalítica aumentada ou diminuída em resposta a determinados sinais. Ajustes na velocidade das reações catalisadas pelas enzimas e conseqüentemente na velocidade da seqüência metabólica permitem à célula acertar as mudanças nas necessidades de energia e de biomoléculas requeridas para o crescimento e reparo.

Em muitos sistemas multienzimáticos, a primeira enzima da seqüência é uma enzima reguladora. Catalisar, ainda que somente algumas reações de uma via metabólica que leva a um produto desnecessário, desvia energia e metabólitos de processos mais importantes. Portanto, um lugar excelente para regular uma via metabólica é no ponto de comprometimento da seqüência metabólica. As outras enzimas na seqüência estão usualmente presentes em quantidades que fornecem um excesso de atividade catalítica. Geralmente elas promovem suas reações tão rapidamente quanto seus substratos são disponibilizados a partir das reações precedentes.

A atividade das enzimas reguladoras é modulada de várias maneiras. Existem duas grandes classes de enzimas reguladoras nas vias metabólicas. As **enzimas alostéricas** funcionam por meio da ligação não-covalente reversível de compostos reguladores chamados **moduladores alostéricos**, que geralmente são pequenos metabólitos ou co-fatores. Outras enzimas são reguladas por meio de uma modificação covalente reversível. Ambas as classes de enzimas reguladoras tendem a apresentar subunidades múltiplas e, em alguns casos, os sítios reguladores e o sítio ativo estão em subunidades separadas.

Existem pelo menos outros dois mecanismos de regulação da atividade enzimática. Algumas enzimas são estimuladas ou inibidas quando estão ligadas por outras proteínas regulatórias. Outras são ativadas quando segmentos peptídicos são removidos por meio de uma clivagem proteolítica. Diferentemente da

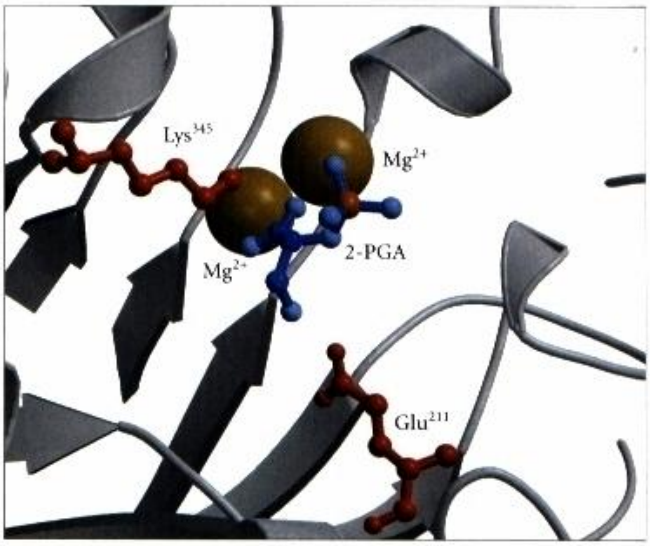


2-Fosfoglicerato ligado à enolase

Intermediário enólico

Fosfoenolpiruvato

(a)



(b)

Figura 8-22 – As duas etapas da reação catalisada pela enolase. (**a**) Mecanismo de transformação do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato pela enolase. O grupo carbonila do 2-fosfoglicerato é coordenado por dois íons magnésio no centro ativo. Um próton é removido por meio de uma catálise básica geral (Lys^{345}). O intermediário enólico resultante é estabilizado pelos dois íons Mg^{2+}. A eliminação subseqüente do —OH é facilitada por uma catálise ácida geral (Glu^{211}). (**b**) O substrato 2-fosfoglicerato em relação aos íons magnésio, Lys^{345} e Glu^{211} no centro ativo da enolase. Os átomos de H não são mostrados. Todos os átomos de oxigênio no 2-fosfoglicerato constam em azul-claro; o fósforo em laranja.

regulação mediada por um efetor, a regulação por meio de uma quebra proteolítica é irreversível. Exemplos importantes desses dois mecanismos são encontrados em processos fisiológicos, tais como a digestão, a coagulação sangüínea, a ação hormonal e o processo da visão.

O crescimento celular e a sobrevivência dependem do uso eficiente dos recursos disponibilizados pelas enzimas reguladoras. Nenhuma regra única governa a ocorrência dos diferentes tipos e regulação nos diferentes sistemas. De um certo modo, a regulação alostérica (não-covalente) permite um ajuste fino das vias metabólicas que são requeridas continuamente, mas em diferentes níveis de atividade, à medida que condições celulares mudam. A regulação por modificação covalente pode ser tudo ou nada — principalmente no caso de quebra proteolítica — ou pode permitir mudanças tênues na atividade. Múltiplos tipos de regulação são observados em um grande número de enzimas reguladoras. O restante deste capítulo será destinado à regulação das enzimas.

As enzimas alostéricas sofrem mudanças conformacionais em resposta à ligação do modulador

Conforme visto no Capítulo 7, as proteínas alostéricas são aquelas que apresentam "outras formas" ou conformações induzidas pela ligação dos moduladores. O mesmo conceito se aplica para determinadas enzimas reguladoras, em que mudanças conformacionais induzidas por um ou mais moduladores interconvertem formas mais e menos ativas da enzima. Os moduladores das enzimas reguladoras podem ser tanto inibidores como estimuladores. Geralmente o próprio substrato é um ativador da enzima. As enzimas reguladoras cujos substrato e modulador são idênticos são chamadas homotrópicas. O efeito é similar à ligação do O_2 à hemoglobina, uma proteína que não tem atividade enzimática (Capítulo 7). A ligação do substrato causa mudanças conformacionais que afetam a subseqüente atividade dos outros sítios na proteína. Quando o modulador é uma molécula diferente do substrato, a enzima é chamada heterotrópica.

É importante que os moduladores alostéricos não sejam confundidos com os inibidores incompetitivos e mistos. Embora estes últimos se liguem a um segundo sítio na enzima, eles não promovem necessariamente mudanças conformacionais entre as formas ativa e inativa. Além disso, os efeitos cinéticos são distintos.

As propriedades das enzimas alostéricas são significantemente diferentes das das meras enzimas não-reguladoras. Algumas das diferenças são estruturais. Além do sítio ativo, as enzimas alostéricas apresentam um ou mais sítios reguladores ou alostéricos para a ligação do modulador (Fig. 8-23). Tal como o centro ativo é específico para o seu substrato, cada sítio regulador é específico para seu modulador. Nas enzimas que apresentam vários moduladores geralmente existem sítios de ligação específicos diferentes para cada um deles. Nas enzimas homotrópicas, o centro ativo e o sítio regulatório são os mesmos.

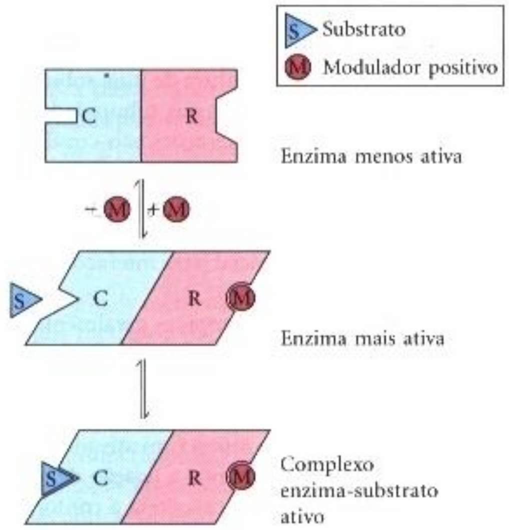


Figura 8-23 – Interações entre as subunidades em uma enzima alostérica e interações com os inibidores e ativadores. Em muitas enzimas alostéricas, o sítio de ligação do substrato e o(s) sítio(s) de ligação dos moduladores estão em subunidades diferentes, a subunidade catalítica (C) e a reguladora (R), respectivamente. A ligação de um modulador (M) positivo (estimulador) ao seu sítio específico na subunidade reguladora é comunicada à subunidade catalítica por meio de uma mudança conformacional. Essa mudança ativa a subunidade catalítica que passa a ligar o substrato (S) com alta afinidade. Quando ocorre a dissociação do modulador da subunidade reguladora, a enzima reverte para sua forma inativa ou menos ativa.

As enzimas alostéricas geralmente são maiores e mais complexas que as enzimas não-alostéricas. A maioria apresenta duas ou mais cadeias polipeptídicas ou subunidades. A aspartato transcarbamilase, que catalisa a primeira reação da biossíntese de nucleotídeos de pirimidina (Capítulo 22), apresenta 12 cadeias polipeptídicas organizadas em subunidades catalíticas e reguladoras. A Figura 8-24 mostra a estrutura quaternária dessa enzima, deduzida de análise de raios X.

A etapa reguladora em muitas vias é catalisada por uma enzima alostérica

Em alguns sistemas multienzimáticos, a enzima reguladora é inibida especificamente pelo produto final da via sempre que a sua concentração exceder as necessidades celulares. Quando a reação catalisada pela enzima reguladora diminui, todas as enzimas subseqüentes operam em velocidades reduzidas, uma vez que as concentrações de seus substratos diminuem. A velocidade de produção do produto final da via é, portanto, balanceada com as necessidades celulares. Esse tipo de regulação é chamado de **inibição por retroalimentação**. O aumento da concentração do produto final da via basicamente desacelera toda a via.

Um dos primeiros exemplos de inibição alostérica por retroalimentação descrito foi o sistema enzimático de bactéria que catalisa a conversão de L-treonina em L-isoleucina (Fig. 8-25). A primeira enzima desse sistema, a L-treonina desidratase, é inibida pela L-isoleucina, o produto da última reação da via. Este é um exemplo de inibição alostérica heterotrópica e a isoleucina é um inibidor muito específico. Nenhum outro intermediário nessa seqüência inibe a treonina desidratase, e nenhuma outra enzima da seqüência é inibida pela isoleucina. A isoleucina não se liga ao sítio ativo, mas a um outro sítio específico na molécula da enzima, o sítio regulador. Essa ligação é do tipo não-covalente e facilmente reversível. Se a concentração de isoleucina diminui, a atividade da treonina desidratase aumenta. Desse modo, a atividade da treonina desidratase responde rápida e reversivelmente às variações da concentração da isoleucina na célula.

As propriedades cinéticas das enzimas alostéricas divergem do comportamento de Michaelis-Menten

As enzimas alostéricas apresentam relações entre V_0 e [S] que diferem da cinética de Michaelis-Menten. Elas apresentam saturação pelo substrato quando [S] é suficientemente grande mas, para algumas enzimas alostéricas, o gráfico de V_0 *versus* [S] (Fig. 8-26) resulta em uma curva de saturação sigmoidal em vez da curva hiperbólica típica das enzimas não-reguladoras. Embora seja pos-

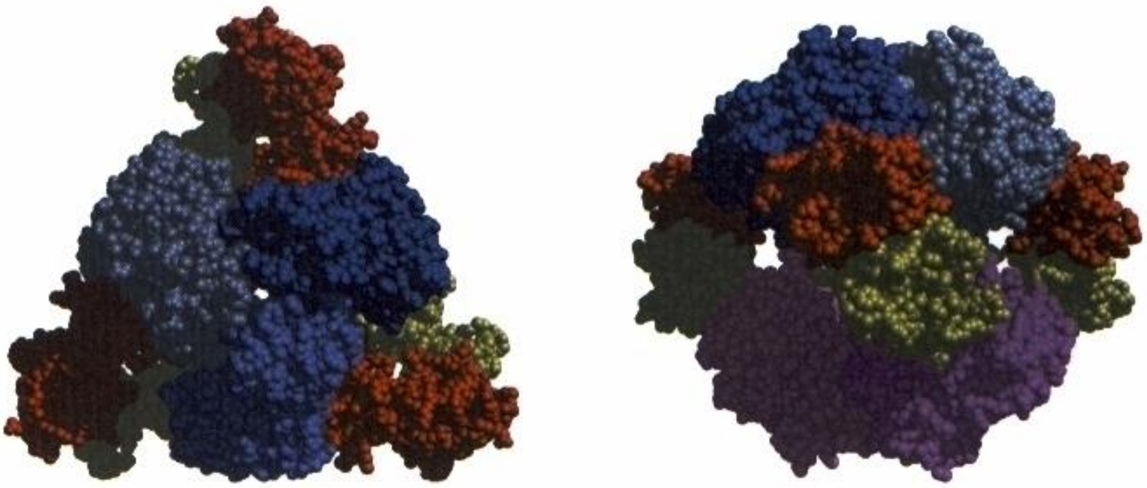


Figura 8-24 – Duas vistas da enzima reguladora aspartato transcarbamilase. Esta enzima reguladora alostérica tem dois arranjos catalíticos agrupados, cada um com três cadeias polipeptídicas catalíticas (sombreados de azul e púrpura), e três arranjos reguladores agrupados, cada um com duas cadeias polipeptídicas reguladoras (vermelho e amarelo). Os arranjos reguladores formam os pontos de um triângulo que rodeia as subunidades catalíticas. Os sítios de ligação para os moduladores alostéricos estão nas subunidades reguladoras. A ligação do modulador provoca grandes modificações na conformação e na atividade da enzima. A função dessa enzima na síntese de nucleotídeos e os detalhes da sua regulação serão discutidos no Capítulo 22. (Cortesia de Ray Steven, Universidade da Califórnia, Berkeley.)

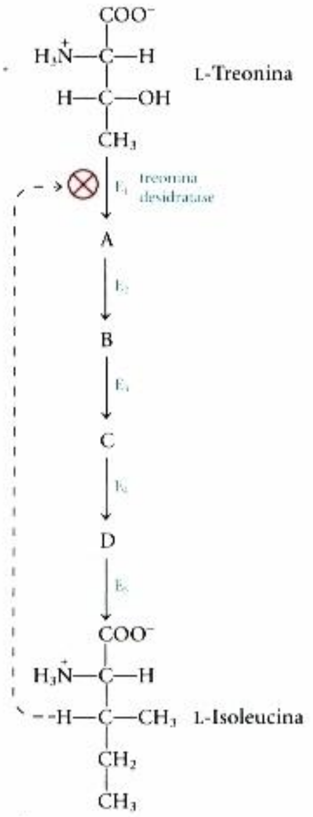


Figura 8-25 – Inibição por retroalimentação. A conversão da L-treonina em L-isoleucina é catalisada por uma seqüência de cinco enzimas (E_1 a E_5). A L-treonina desidratase (E_1) é inibida específica e alostericamente pela L-isoleucina, o produto final da seqüência, mas por nenhum dos quatro intermediários (A a D). A inibição por retroalimentação está indicada pela linha tracejada e pelo símbolo ⊗ na seta da reação catalisada pela treonina desidratase, um esquema que é usado neste livro.

sível encontrar um valor de [S] na curva de saturação sigmoidal para a qual V_0 é a metade da velocidade máxima, não se pode referir a ela como designando o K_m, pois a enzima não segue o comportamento hiperbólico de Michaelis-Menten. Como substituto, o símbolo $[S]_{0,5}$ ou $K_{0,5}$ é freqüentemente usado para representar a concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima da reação catalisada por uma enzima alostérica (Fig. 8-26).

O comportamento cinético sigmoidal geralmente reflete interações cooperativas entre múltiplas subunidades protéicas. Em outras palavras, mudanças na estrutura de uma subunidade são traduzidas em mudanças estruturais nas subunidades adjacentes, um efeito que é mediado por interações não-covalentes na(s) interface(s) subunidade-subunidade. Os princípios são muito bem ilustrados pela ligação do O_2 à hemoglobina (Capítulo 7). O comportamento cinético sigmoidal é explicado pelos modelos da simetria ajustada e seqüencial para interações de subunidades (veja Fig. 7-14).

As enzimas alostéricas homotrópicas geralmente apresentam múltiplas subunidades. Conforme salientado anteriormente, o mesmo sítio de ligação em cada subunidade pode funcionar tanto como sítio ativo quanto como sítio regulador. O substrato pode ser um modulador positivo (um ativador) porque as subunidades atuam cooperativamente: a ligação de uma molécula do substrato a um sítio de ligação altera a conformação da enzima e favorece a ligação de outras moléculas do substrato. Isso explica o aumento sigmoidal, e não o hiperbólico, de V_0 com o aumento da [S]. Uma característica da cinética sigmoidal é que pequenas mudanças na concentração de um modulador podem ser associadas a grandes mudanças na atividade. Como fica evidente na Figura 8-26a, um aumento relativamente pequeno na [S], na parte ascendente da curva, provoca um aumento comparativamente grande em V_0.

Para as enzimas alostéricas heterotrópicas, cujo modulador é um metabólito diferente do substrato, é difícil fazer generalizações acerca da forma da curva de saturação pelo substrato. Um ativador pode tornar a curva mais próxima de uma hipérbole, com uma diminuição no $K_{0,5}$ mas sem mudanças em $V_{máx}$, resultando assim em uma maior velocidade de reação para uma concentração fixa de substrato (V_0 é maior para qualquer valor de [S]) (Fig. 8-26b, curva superior). Outras enzimas alostéricas heterotrópicas respondem a um ativador por meio de um aumento de $V_{máx}$ com uma pequena variação no $K_{0,5}$ (Fig. 8-26c). Um modulador negativo (um inibidor) pode produzir uma curva de saturação pelo substrato *mais* sigmoidal, com um aumento no $K_{0,5}$ (Fig. 8-26b, curva inferior). As enzimas alostéricas heterotrópicas podem apresentar diferentes tipos de respostas nas suas curvas de variação da atividade em função da [S] porque várias apresentam moduladores inibidores, várias apresentam moduladores ativadores e várias apresentam ambos os tipos.

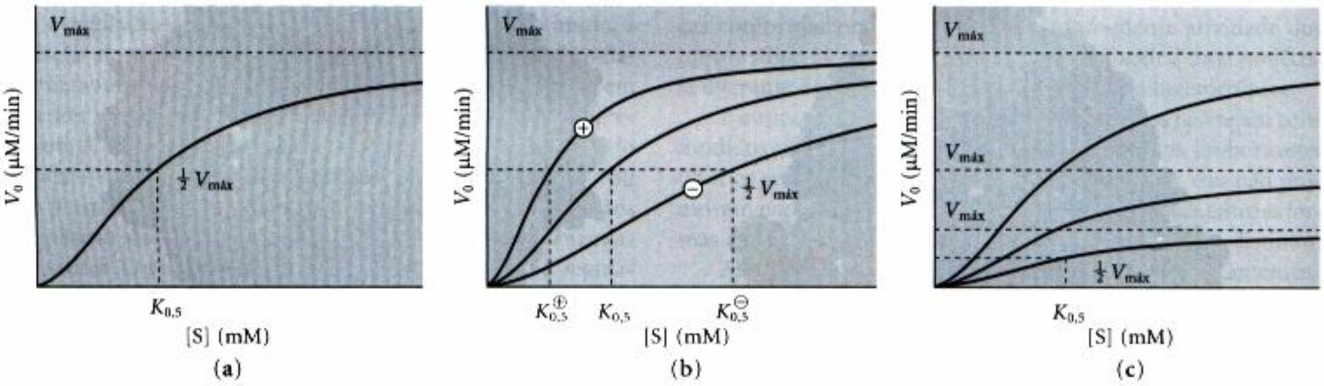


Figura 8-26 – Curvas de variação da atividade em função da concentração do substrato para enzimas alostéricas representativas. Três exemplos de respostas complexas dadas por enzimas alostéricas aos seus reguladores. (**a**) Curva sigmoidal de uma enzima homotrópica em que o substrato também atua como um modulador positivo (estimulador) ou ativador. Note a semelhança com a curva de saturação da hemoglobina pelo oxigênio (veja Fig. 7-12). (**b**) Efeitos de um modulador positivo ⊕ e um modulador negativo ⊖ sobre uma enzima alostérica em que $K_{0,5}$ é alterado sem mudanças na $V_{máx}$. A curva central mostra a relação entre atividade e concentração do substrato sem um modulador. (**c**) Tipo menos comum de modulação em que $V_{máx}$ é alterada e $K_{0,5}$ permanece quase constante.

Algumas enzimas reguladoras sofrem modificações covalentes reversíveis

Em uma outra classe importante de enzimas reguladoras, a atividade é regulada por modificação covalente da molécula da enzima. Entre os grupos modificadores estão: fosfato, adenosina monofosfato, uridila monofosfato, adenosina difosfato ribose e grupos metila (Fig. 8-27). Esses grupos geralmente são ligados covalentemente e removidos da enzima reguladora por outras enzimas.

Um exemplo de metilação é a proteína quimiotática aceptora de grupos metila de bactérias. Essa proteína é parte de um sistema que permite uma bactéria mover-se em direção a uma substância atrativa (tal como um açúcar) em solução e se distanciar de uma substância repelente. O agente metilante é o S-adenosilmetionina (adoMet) descrito no Capítulo 18. Uma reação especialmente interessante é a ADP-ribosilação observada em algumas poucas proteínas. A ADP-ribose é derivada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (veja Fig. 10-41). Esse tipo de modificação ocorre para a enzima bacteriana dinitrogenase redutase, resultando na regulação do importante processo de fixação biológica do nitrogênio. Além disso, as toxinas da difteria e do cólera são enzimas que catalisam a ADP-ribosilação (e inativação) de enzimas celulares de grande importância e proteínas. A toxina da difteria age sobre o fator de elongação 2, uma proteína envolvida na biossíntese de proteínas, e o inibe. A toxina do cólera age sobre uma proteína específica (uma proteína G específica que é parte de uma via de sinalização, veja Fig. 13-28), levando fundamentalmente a várias respostas fisiológicas que inclui a perda maciça de fluidos corporais e algumas vezes a morte.

As fosforilações representam a grande maioria das modificações reguladoras conhecidas. Cerca de um terço ou até mesmo a metade de todas as proteínas de uma célula eucariótica é fosforilado. Algumas proteínas apresentam apenas um resíduo fosforilado, outras apresentam vários e algumas poucas apresentam dúzias de sítios para fosforilação. Esse tipo de modificação covalente é fundamental para um grande número de vias reguladoras e por esse motivo será tratado detalhadamente a seguir.

Os grupos fosfato afetam a estrutura e a atividade catalítica das proteínas

A ligação de grupos fosfato a resíduos de aminoácidos específicos de uma proteína é catalisada por **proteínas quinases** e a remoção desses grupos é catalisada por proteínas fosfatases. A adição de um grupo fosfato a um resíduo de Ser, Thr ou Tyr introduz um grupo volumoso e carregado em uma região que era apenas moderadamente polar. Os oxigênios do grupo fosfato são capazes de formar ligações de hidrogênio com um ou vários gru-

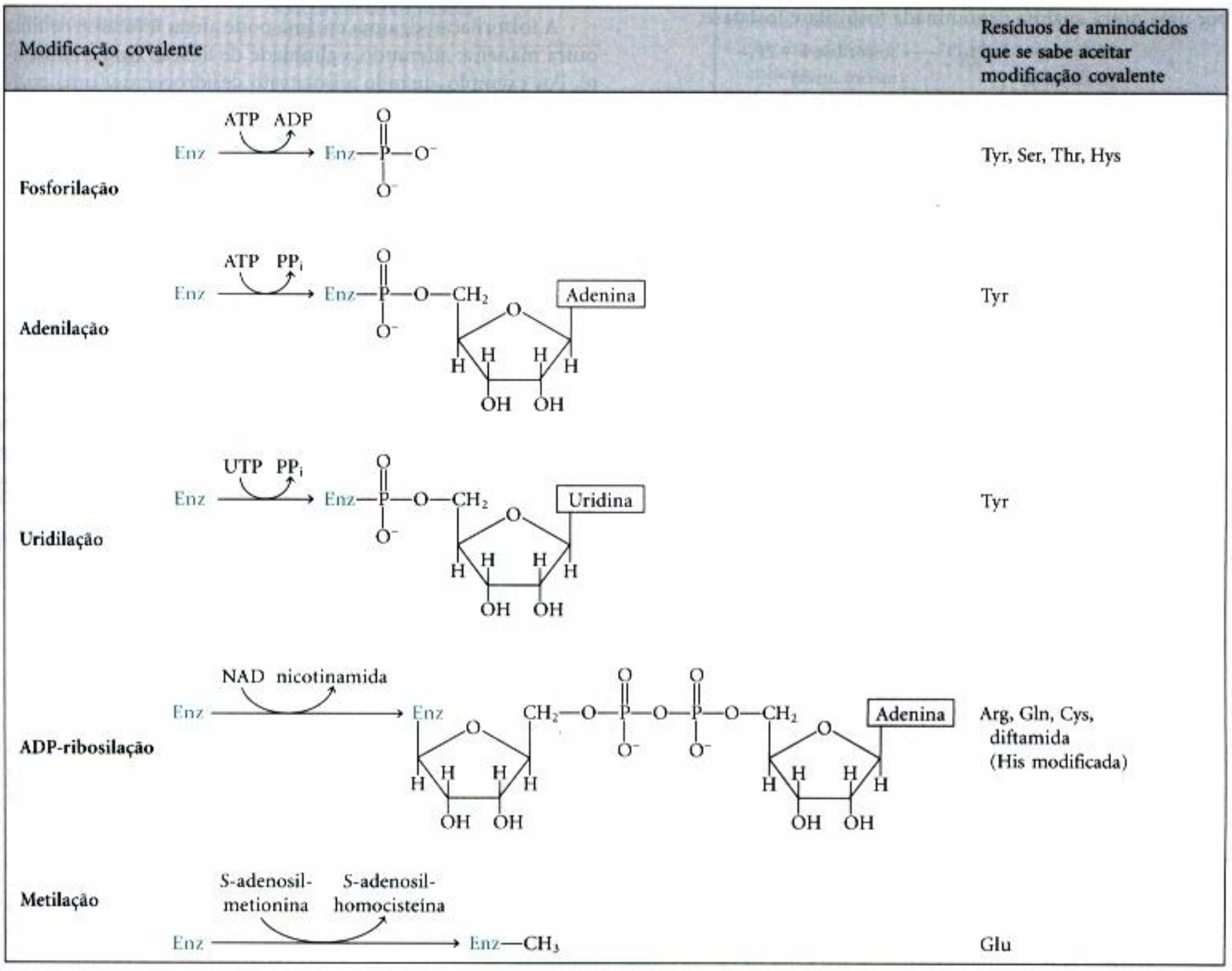

Modificação covalente
Resíduos de aminoácidos que se sabe aceitar modificação covalente
Fosforilação
ATP ADP
Enz
Enz—P—O⁻
Tyr, Ser, Thr, Hys
Adenilação
ATP PPi
Enz—P—O—CH₂
Adenina
OH OH
Tyr
Uridilação
UTP PPi
Uridina
Tyr
ADP-ribosilação
NAD nicotinamida
Adenina
Arg, Gln, Cys, diftamida (His modificada)
Metilação
S-adenosil-metionina
S-adenosil-homocisteína
Enz—CH₃
Glu

Figura 8-27 – Exemplos de reações de modificação de enzimas.

pos em uma proteína, geralmente os grupos amida do esqueleto peptídico no início de uma α-hélice ou então com grupos guanidino carregados das cadeias laterais da Arg. A dupla carga negativa na cadeia lateral fosforilada também pode repelir grupos vizinhos de resíduos carregados negativamente (Asp ou Glu). (Nenhuma cadeia lateral de aminoácido não-modificada apresenta duas cargas negativas.) Quando a cadeia lateral modificada está localizada em uma região da proteína que é crítica para a sua estrutura tridimensional, podem-se esperar efeitos dramáticos da fosforilação na conformação da proteína e por conseguinte na ligação do substrato e catálise.

Um exemplo importante de regulação pela fosforilação é observado na glicogênio fosforilase (M_r 94.500) do músculo e fígado (Capítulo 15) que catalisa a reação:

$$\underset{\text{Glicogênio}}{(\text{Glicose})_n} + \text{P}_i \longrightarrow \underset{\substack{\text{Glicogênio}\\ \text{com cadeia}\\ \text{diminuída}}}{(\text{glicose})_{n-1}} + \text{glicose-1-fosfato}$$

A glicose-1-fosfato assim formada pode ser usada para a síntese de ATP no músculo ou convertida em glicose livre no fígado. A glicogênio fosforilase ocorre em duas formas: a forma mais ativa ou fosforilase *a* e a forma menos ativa ou fosforilase *b* (Fig. 8-28). A fosforilase *a* tem duas subunidades, cada uma delas com um resíduo de serina específico que é fosforilado no seu grupo hidroxila. Esses resíduos de serina-fosfato são requeridos para a atividade máxima da enzima. Os grupos fosfato podem ser removidos da fosforilase *a* por meio de uma hidrólise efetuada por uma outra enzima denominada fosforilase fosfatase:

$$\underset{\text{(mais ativa)}}{\text{Fosforilase } a} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \underset{\text{(menos ativa)}}{\text{fosforilase } b} + 2\text{P}_i$$

Nesta reação a fosforilase *a* é convertida em fosforilase *b* pela quebra de duas ligações covalentes de serina-fosfato, uma em cada subunidade da glicogênio fosforilase.

A fosforilase *b*, por sua vez, pode ser reativada novamente — transformada covalentemente em fosforilase *a* ativa — por uma outra enzima, a fosforilase quinase que catalisa a transferência dos grupos fosfato do ATP para os grupos hidroxila de dois resíduos específicos de serina na fosforilase *b*:

$$2\text{ATP} + \underset{\text{(menos ativa)}}{\text{fosforilase } b} \longrightarrow 2\text{ADP} + \underset{\text{(mais ativa)}}{\text{fosforilase } a}$$

A quebra do glicogênio nos músculos esqueléticos e no fígado é regulada por variações na relação entre as duas formas da glicogênio fosforilase. As formas *a* e *b* da fosforilase diferem nas suas estruturas secundária, terciária e quaternária. O centro ativo sofre mudanças na sua estrutura e, conseqüentemente, mudanças na sua atividade catalítica à medida que as duas formas se interconvertem.

A regulação da glicogênio fosforilase pela fosforilação ilustra os efeitos da fosforilação sobre a estrutura e a atividade catalítica (Fig. 8-29). No estado não-fosforilado, cada subunidade dessa proteína está enovelada de tal forma a juntar 20 resíduos da extremidade aminoterminal, incluindo um certo número de resíduos básicos, em uma região contendo vários aminoácidos. Isso produz uma interação eletrostática que estabiliza a conformação. A fosforilação da Ser^{14} interfere com essa interação, forçando o domínio do grupo aminoterminal para fora do ambiente ácido e para uma conformação que permita a interação entre Ⓟ–Ser e várias cadeias laterais da Arg. Nessa conformação, a enzima é muito mais ativa.

A fosforilação de uma enzima pode afetar a catálise de uma outra maneira: alterando a afinidade de ligação com o substrato. Por exemplo, quando a isocitrato desidrogenase (uma enzima do ciclo do ácido cítrico; Capítulo 16) é fosforilada, a repulsão eletrostática pelo grupo fosfato impede a ligação do citrato (um ácido tricarboxílico) no centro ativo.

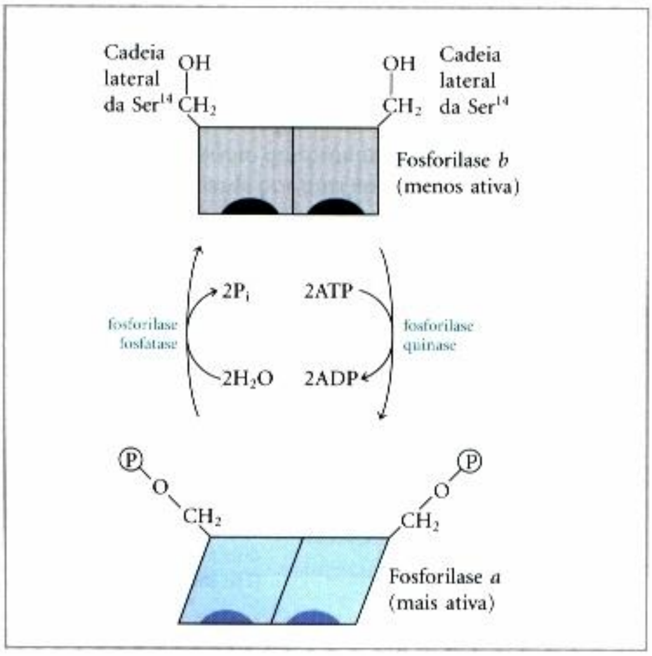


Figura 8-28 – Regulação da atividade da glicogênio fosforilase por modificação covalente. Na forma mais ativa da enzima, fosforilase a, um resíduo específico de serina em cada subunidade está fosforilado. A fosforilase *a* é convertida na fosforilase *b*, menos ativa, por meio da perda enzimática desses grupos fosfato que é catalisada pela fosforilase fosfatase. A fosforilase *b* pode ser reconvertida (reativada) na fosforilase *a* pela ação da fosforilase quinase.

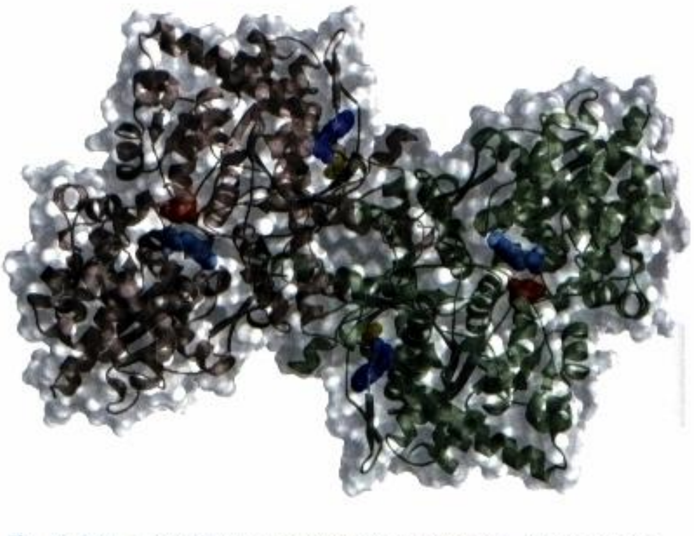


Figura 8-29 – Regulação da glicogênio fosforilase. Devido ao seu papel central no metabolismo intermediário, a glicogênio fosforilase está sujeita a vários níveis de regulação. Esta representação transparente da molécula simétrica da glicogênio fosforilase a mostra os sítios de regulação por modificação covalente (fosforilação da Ser^{14}, amarelo) e ativação alostérica pelo AMP (azul-escuro) em cada uma das duas subunidades. A glicose (vermelho) está ligada ao sítio ativo. O piridoxal fosfato (PLP; azul-claro), um derivado da vitamina B_6, é um co-fator ligado à enzima. Na glicogênio fosforilase, o PLP participa na catálise ácido-base geral, um papel não usual para esse co-fator, cujas funções mais típicas serão descritas em detalhe no Capítulo 18. Note quão distantes os sítios reguladores estão do centro ativo da enzima.

As interações entre as subunidades de proteínas estruturais oligoméricas podem ser alteradas pela fosforilação no sítio de interação. Por exemplo, a fosforilação de proteínas do citoesqueleto influencia o seu arranjo em estruturas supramoleculares. Tem sido relatado que a proteína-2, associada a microtúbulos, tem mais de trinta sítios capazes de ser fosforilados.

Fosforilações múltiplas proporcionam um apurado controle regulador

Os resíduos de Ser, Thr ou Tyr que não estão fosforilados nas proteínas reguladoras ocorrem no interior de motivos estruturais comuns, as chamadas seqüências de consenso que são reconhecidas por proteínas quinases (Tabela 8-9). Algumas quinases são basófilas, preferindo fosforilar um resíduo que apresenta vizinhos básicos; outras têm diferentes preferências por substratos, tal como um resíduo próximo a uma prolina. A seqüência primária não é o único fator para determinar se um dado resíduo será fosforilado. O enovelamento da proteína aproxima resíduos que estão afastados na seqüência primária, e a estrutura tridimensional resultante pode determinar se a proteína quinase tem acesso a um dado resíduo, reconhecendo-o como um substrato. Um fator que influencia a especificidade de substrato de certas proteínas quinases é a proximidade de outros resíduos fosforilados.

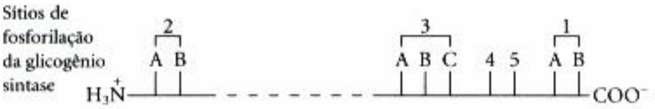
Tabela 8-9 – Seqüência de consenso para proteínas quinases

Proteína quinase	Seqüência de consenso resíduo fosforilado*
Proteína quinase A	–X–R–(R/K)–X–(S/T)–B–
Proteína quinase G	–X–R–(R/K)–X–(S/T)–X–
Proteína quinase C	–(R/K)–(R/K)–X–(S/T)–B–(R/K)–(R/K)–
Proteína quinase B	–X–R–X–(S/T)–X–K–
Ca^{2+}/calmodulina quinase I	–B–X–R–X–X–(S/T)–X–X–X–B–
Ca^{2+}/calmodulina quinase II	–B–X–(R/K)–X–X–(S/T)–X–X–
Quinase da cadeia leve da miosina (músculo esquelético)	–K–K–R–X–X–S–X–B–B–
Fosforilase *b* quinase	*–K–R–K–Q–I–S–V–R–*
Quinase regulada por sinal extracelular (ERK)	–P–X–(S/T)–P–P–
Proteína quinase dependente de ciclina (cdc2)	–X–(S/T)–P–X–(K/R)–
Caseína quinase I	–(Sp/Tp)–X–X–(X)–(S/T)–B
Caseína quinase II	–X–(S/T)–X–X–(E/D/Sp/Yp)–X–
Quinase do receptor β-adrenérgico	–(D/E)$_n$–(S/T)–X–X–X–
Rodopsina quinase	–X–X–(S/T)–(E)$_n$–
Quinase do receptor da insulina	–X–E–E–E–Y–M–M–M–M–*K–K–S–R–G–* *D–Y–M–T–M–Q–I–G–K–K–K–L–P–A–* *T–G–D–Y–M–N–M–S–P–V–G–D–*
Quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF)	*–E–E–E–E–Y–F–E–L–V–*

Fontes: Pinna LA & Ruzzene MH. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191-225. Kemp BE & Pearson RB. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342-346. Kennelly PJ & Krebs EG. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15.555-15.558.

* São mostradas aqui as seqüências de consenso (em tipo normal) e as seqüências reais de substratos conhecidos (em itálico). Os resíduos de Ser (S), Thr (T) ou Tyr (Y) que sofrem fosforilação estão em vermelho; todos os aminoácidos estão mostrados na forma de suas abreviações de uma letra (veja Tabela 5-1). X representa qualquer aminoácido; B, qualquer aminoácido hidrofóbico; Sp, Tp e Yp, os resíduos de Ser, Thr e Tyr já fosforilados.

A regulação pela fosforilação freqüentemente é muito complicada. Algumas proteínas apresentam seqüências de consenso reconhecidas por várias proteínas quinases diferentes, cada uma podendo fosforilar a proteína e alterar a sua atividade. Em alguns casos, a fosforilação é hierárquica: certos resíduos podem ser fosforilados somente se o resíduo vizinho tiver sido fosforilado primeiro. Por exemplo, a glicogênio sintase é inativada pela fosforilação de resíduos específicos de serina e também é modulada pelo menos por quatro outras proteínas quinases que fosforilam quatro outros sítios na proteína (Fig. 8-30). A proteína não é uma substrato para a glicogênio sintase quinase 3, por exemplo, até que um dos sítios tenha sido fosforilado pela caseína quinase II. Algumas fosforilações inibem a glicogênio sintase mais que outras, e algumas combinações de fosforilação são cumulativas. Essas fosforilações reguladoras múltiplas proporcionam o potencial para as modulações extremamente sutis da atividade enzimática.



Quinase	Sítios de fosforilação da glicogênio sintase	Grau de inativação da sintase
Proteína quinase A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteína quinase G	1A, 1B, 2	+
Proteína quinase C	1A	+
Ca^{2+}/calmodulina quinase	1B, 2	+
Fosforilase *b* quinase	2	+
Caseína quinase I	Pelo menos 9 sítios	+ + + +
Caseína quinase II	5	0
Glicogênio sintase quinase 3	3A, 3B, 3C	+ + +
Glicogênio sintase quinase 4	2	+

Figura 8-30 – Fosforilações reguladoras múltiplas. A enzima glicogênio sintase apresenta pelo menos nove sítios diferentes em cinco regiões designadas para fosforilação por uma das proteínas quinases celulares. Por conseguinte, a atividade dessa enzima está sujeita à modulação em resposta a uma variedade de sinais. Assim, a regulação não é simplesmente um disjuntor binário (liga/desliga), mas uma modulação finamente ajustada da atividade em um grande intervalo.

Para atuar como um mecanismo regulador eficiente, a fosforilação deve ser reversível. Geralmente os grupos fosfato são adicionados e removidos por diferentes enzimas, e os processos podem ser regulados separadamente. As células apresentam uma família de fosfoproteínas fosfatases que hidrolisam ésteres de Ser–Ⓟ, Thr–Ⓟ e Tyr–Ⓟ, liberando P_i. As fosfoproteínas fosfatases conhecidas atuam sobre um conjunto de fosfoproteínas, porém elas apresentam uma especificidade de substrato menor que as proteínas quinases. Embora as fosfoproteínas fosfatases ainda não estejam completamente estudadas como as proteínas quinases, elas também parecem ser importantes na regulação dos processos celulares e do metabolismo.

Alguns tipos de regulação requerem a proteólise de um precursor enzimático

Para algumas enzimas, um precursor inativo, chamado **zimogênio**, é hidrolisado para formar a enzima ativa. Muitas enzimas proteolíticas (proteases) do estômago e do pâncreas são

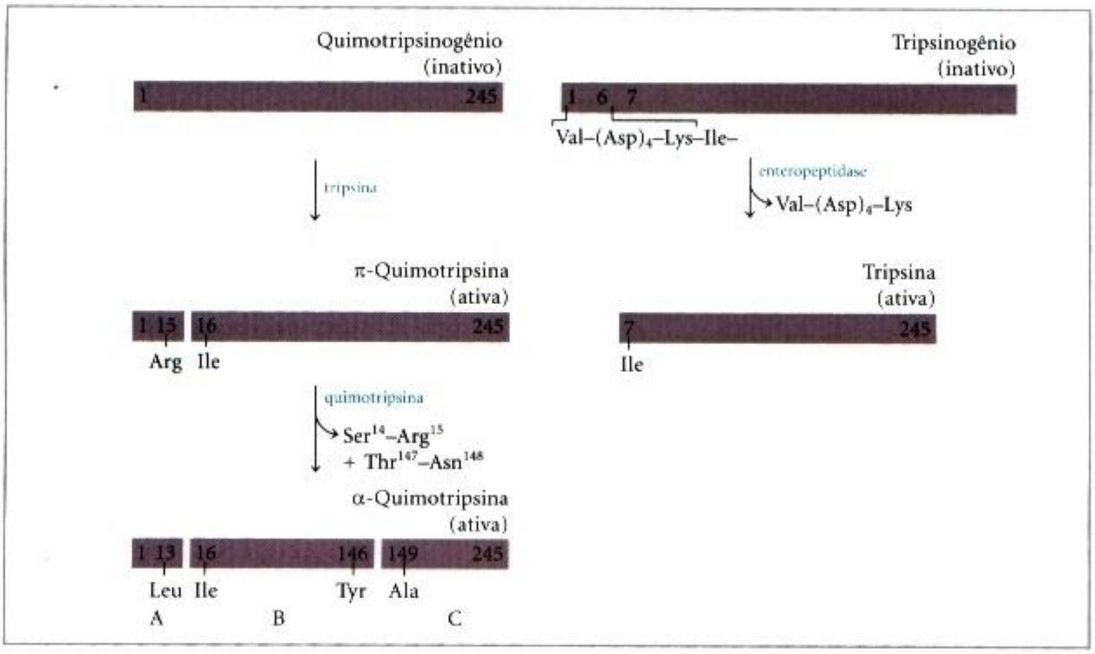


Figura 8-31 – Ativação de zimogênios por clivagem proteolítica. É mostrada a formação da quimotripsina e da tripsina a partir de seus zimogênios. As barras representam as seqüências primárias das cadeias polipeptídicas. Os aminoácidos nas extremidades dos fragmentos polipeptídicos gerados pela clivagem estão indicados abaixo das barras. Os números dos resíduos de aminoácidos representam as suas posições na seqüência primária dos zimogênios quimotripsinogênio ou tripsinogênio (o aminoácido terminal é o número um). Lembrar que as três cadeias polipeptídicas (A, B e C) da quimotripsina estão ligadas por pontes dissulfeto (veja Fig. 8-18).

reguladas dessa forma. A quimotripsina e a tripsina são inicialmente sintetizadas como quimotripsinogênio e tripsinogênio, respectivamente (Fig. 8-31). A quebra específica provoca mudanças conformacionais que expõem o sítio ativo da enzima. Uma vez que esse tipo de ativação é irreversível, outros mecanismos são necessários para inativar essas enzimas. As proteases são inativadas por proteínas inibidoras que se ligam muito fortemente ao sítio ativo da enzima. Por exemplo, o inibidor da tripsina pancreática (M_r 6.000) liga-se à tripsina e a inibe; a α_1-antiproteínase (M_r 53.000) inibe primariamente a elastase de neutrófilos. Uma insuficiência de α_1-antiproteínase, que pode ser causada pela exposição à fumaça de cigarros, tem sido associada com lesão do pulmão, incluindo enfisema.

As proteases não são as únicas proteínas ativadas por proteólise. Porém, em outros casos, os precursores são chamados mais freqüentemente de **proproteínas** ou **proenzimas** em vez de zimogênio. Por exemplo, o colágeno, uma proteína do tecido conectivo, é sintetizado inicialmente na forma do precursor solúvel procolágeno. O sistema de coagulação sangüínea apresenta muitos exemplos de ativação proteolítica de proteínas. A fibrina, uma proteína do coágulo sangüíneo, é produzida pela proteólise de sua proteína inativa, o fibrinogênio. A protease responsável por essa ativação é a trombina (similar em muitos aspectos à quimotripsina), que por sua vez é produzida pela proteólise da protrombina (neste caso um zimogênio), protrombina. A coagulação sangüínea é mediada por uma complicada cascata de ativação de zimogênios.

Algumas enzimas reguladoras usam mecanismos de regulação múltiplos

A glicogênio fosforilase catalisa a primeira reação de uma via que alimenta com glicose armazenada o metabolismo de carboidratos que produz energia (Capítulo 15). Esse é um importante passo metabólico e a sua regulação é correspondentemente complexa. Embora a sua regulação primária ocorra por meio de modificação covalente, como delineada na Fig. 8-28, a glicogênio fosforilase também é modulada de uma maneira alostérica e não covalente pelo AMP, que é um ativador da fosforilase *b*, e por várias outras moléculas que são inibidores.

Outras enzimas reguladoras complexas são encontradas em cruzamentos metabólicos chaves. A glutamina sintetase de bactérias, que catalisa uma das etapas que introduz nitrogênio reduzido no metabolismo celular (Capítulo 22), é uma das mais complexas enzimas reguladoras conhecidas. Ela é regulada por alosteria (com pelo menos oito moduladores alostéricos diferentes) e por modificação covalente reversível. Ela também é regulada pela associação de outras proteínas reguladoras, um mecanismo já comentado muito brevemente neste capítulo mas que será examinado detalhadamente quando considerarmos a regulação de vias metabólicas específicas.

Qual é a vantagem de tal complexidade na regulação da atividade enzimática? Começamos este capítulo enfatizando a importância central da catálise para a existência da vida. O controle da catálise também é crítico para a vida. Se todas as possíveis reações em uma célula forem catalisadas simultaneamente, as macromoléculas e os metabólitos seriam rapidamente quebrados em formas químicas mais simples. Em vez disso, somente as reações necessárias para a célula em um dado momento são catalisadas. Quando as reservas químicas estão repletas, a glicose e outros metabólitos são sintetizados e armazenados. Quando as reservas estão escassas, esses depósitos são usados para alimentar o metabolismo celular. A energia química é usada economicamente, dividida para várias vias metabólicas à medida que as necessidades celulares ordenarem. A disponibilidade de catalisadores poderosos, cada um específico para uma dada reação, torna possível a regulação dessas reações. Isso, por sua vez, dá origem à uma complexa e altamente ordenada sinfonia que chamamos vida.

Resumo

A vida depende de catalisadores poderosos e específicos: as enzimas. Virtualmente, todas as reações bioquímicas são catalisadas por uma enzima. Com exceção de uns poucos RNAs catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. As enzimas são catalisadores extraordinariamente efetivos que comumente aumentam a velocidade das reações de um fator de 10^5 a 10^{17}. Para ser ativas, algumas enzimas requerem um co-fator químico, que pode estar fraca ou firmemente ligado à enzima. Cada enzima é classificada de acordo com a reação específica que ela catalisa.

As reações catalisadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (o complexo ES). A ligação ocorre em uma fenda na molécula da enzima chamada sítio ativo. A função das enzimas e de outros catalisadores é diminuir a energia de ativação da reação e, dessa forma, aumentar a velocidade da reação. O equilíbrio de uma reação não é afetado pela enzima.

A energia empregada para aumentar a velocidade da reação enzimática é derivada das interações fracas (pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas) entre o substrato e a enzima. O sítio ativo enzimático está estruturado de tal maneira que algumas dessas interações fracas ocorrem preferencialmente no estado de transição da reação, estabilizando assim o estado de transição. A energia disponibilizada pela formação das numerosas ligações fracas entre a enzima e o substrato (a energia de ligação) é substancial e em geral pode explicar as acelerações na velocidade das reações. A necessidade de interações múltiplas é uma das razões para o grande tamanho das enzimas. A energia de ligação pode ser usada para diminuir a entropia do substrato, para tensioná-lo ou provocar uma mudança conformacional na enzima (ajuste induzido). Essa mesma energia de ligação responde pela refinada especificidade das enzimas em relação a seus substratos. Outros mecanismos catalíticos incluem a catálise ácido-base geral e a catálise covalente. Mecanismos de reação detalhados têm sido desenvolvidos para muitas enzimas.

A cinética é uma metodologia importante para o estudo dos mecanismos enzimáticos. A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum. À medida que a concentração do substrato aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumenta de uma forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$ característica, na qual praticamente toda enzima está na forma do complexo ES. A concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis, K_m, que é característica para cada enzima agindo sobre um determinado substrato. A equação de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}\,[S]}{K_m + [S]}$$

relaciona a velocidade inicial de uma reação enzimática com a concentração de substrato e a $V_{\text{máx}}$ pela constante K_m. Tanto o K_m como a $V_{\text{máx}}$ podem ser medidos. Eles têm significados diferentes para enzimas diferentes. Em condições de saturação, a velocidade limite de uma reação catalisada enzimaticamente é descrita pela constante k_{cat}, também chamada número de renovação. A relação k_{cat}/K_m fornece uma boa medida da eficiência catalítica. A equação de Michaelis-Menten é também aplicável às reações com dois substratos, que ocorrem ou pela formação de um complexo ternário ou por uma dupla-troca (pingue-pongue). Cada enzima tem um pH ótimo (ou intervalo de pH) no qual apresenta atividade máxima.

As enzimas podem ser inativadas por modificações irreversíveis de um grupo funcional essencial para atividade catalítica. Elas também podem ser inibidas por moléculas que se ligam reversivelmente. Os inibidores competitivos competem reversivelmente com o substrato pelo centro ativo, mas não são transformados pela enzima. Os inibidores incompetitivos ligam-se somente ao complexo ES, em um sítio distinto do sítio ativo. Na inibição mista, o inibidor liga-se tanto a E como a ES. Neste último caso, em um sítio distinto daquele em que o substrato se liga.

Algumas enzimas regulam a velocidade das vias metabólicas nas células. Na inibição por retroalimentação, o produto final de uma via inibe a primeira enzima dessa via. A atividade de algumas enzimas reguladoras, chamadas enzimas alostéricas, é ajustada pela ligação reversível de um modulador específico a um sítio regulador. Tais moduladores podem ser inibidores ou estimuladores e podem ser o próprio substrato ou então algum outro metabólito. O comportamento cinético das enzimas alostéricas reflete interações cooperativas entre as subunidades da enzima. Outras enzimas reguladoras são moduladas por modificação covalente de um grupo funcional específico necessário para a atividade. A fosforilação de resíduos de aminoácidos específicos é um meio muito comum de regular a atividade da enzima. Muitas enzimas proteolíticas apresentam precursores inativos chamados zimogênio. Pequenos peptídeos são quebrados do zimogênio para formar a protease ativa.

Leitura Adicional

Geral

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52.

Uma coleção de excelentes artigos sobre muitos fundamentos; continua sendo muito útil.

Fersht A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding,* W.H. Freeman and Company, New York.

Uma introdução concisa, clara e de caráter mais avançado.

Friedmann H (ed). (1981) *Benchmark Papers in Biochemistry,* Vol. 1: *Enzymes,* Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, PA.

Uma coleção de artigos clássicos em química de enzima, com comentários históricos pelo editor. Extremamente interessante.

Jencks WP. (1987) *Catalysis in Chemistry and Enzymology,* Dover Publications, Inc., New York.

Um livro proeminente no assunto e de caráter mais avançado.

Kornberg A. (1989) *For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist,* Harvard University Press, Cambridge, MA.

Princípios da catálise

Hansen DE & Raines RT. (1990) Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Educ.* **67**, 483-489.

Um bom texto para o estudante principiante adquirir uma melhor compreensão dos princípios da catálise.

Kraut J. (1988) How do enzymes work? *Science* **242**, 533-540.

Landry DW, Zhao K, Yang GX-Q, Glickman M, & Georgiadis TM. (1993) Antibody degradation of cocaine. *Science* **259**, 1899-1901.

Uma aplicação interessante de anticorpos catalíticos.

Lerner RA, Benkovic SJ & Schulz PG. (1991) At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* **252**, 659-667.

Schramm VL. (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 693-720.

Boas ilustrações dos princípios introduzidos neste capítulo.

Cinética

Cleland WW. (1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* **45**, 273-387.

Radzicka A & Wolfenden R. (1995) A proficient enzyme. *Science* **267**, 90-93.

Exame definitivo do aumento da velocidade por uma enzima que acelera a sua reação por um fator de 10^{17}.

Raines RT & Hansen DE. (1988) An intuitive approach to steady-state kinetics. *J. Chem. Educ.* **65**, 757-759.

Segel IH. (1975) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems,* John Wiley & Sons, Inc., New York.

Um tratamento mais avançado do assunto.

Exemplos de enzimas

Babbit PC & Gerlt JA. (1997) Understanding enzymes superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. *J. Biol. Chem.* **27**, 30.591-30.594.

Uma descrição interessante da evolução das enzimas com diferentes especificidades catalíticas, que utilizam um repertório limitado de motivos estruturais protéicos.

Babbitt PC, Hasson MS, Wedekind JE, Palmer DRJ, Barrett WC, Reed GH, Rayment I, Ringe D, Kenyon GL, & Gerlt JA. (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the α-protons of carboxylic acids. *Biochemistry* **35**, 16.489-16.501.

Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman F, & Hwang JK. (1989) How do serine proteases really work? *Biochemistry* **28**, 3629-3637.

Enzimas reguladoras

Barford D, Das AK, & Egloff M-P. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133-164.

Dische Z. (1976) The discovery of feedback inhibition. *Trends Biochem. Sci.* 1, 269-270.

Hunter T & Plowman GD. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18-22.

Detalhes de uma variedade dessas importantes enzimas em um modelo eucarioto.

Johnson LN & Barford D. (1993) The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 199-232.

Koshland DE Jr & Neet KE. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **37**, 359-410.

Monod J, Changeux J-P, & Jacob F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* **6**, 306-329.

Um artigo clássico introduzindo o conceito de regulação alostérica.

Problemas

1. Conservando o sabor doce do milho. O sabor adocicado do grão de milho recém-colhido é devido ao alto nível de açúcar nos grãos. O milho comprado no mercado, vários dias após a colheita, não é tão doce porque cerca de 50% do açúcar livre do milho é convertido em amido um dia após a colheita. Para preservar o sabor adocicado do milho fresco, as espigas descascadas são mergulhadas em água fervente por alguns minutos ("branqueamento") e então resfriadas em água fria. O milho tratado dessa maneira e depois guardado em congelador mantém seu sabor adocicado. Qual é a base bioquímica desse procedimento?

2. Concentração intracelular de enzimas. Para obter um valor aproximado da concentração de enzimas em uma célula bacteriana considere que ela contém 1.000 enzimas diferentes, em igual concentração no citosol, e que cada proteína tem um peso molecular de 100.000. Considere que uma célula bacteriana é um cilindro (1μm de diâmetro e 2μm de altura), que o citosol (densidade específica 1,20) contém 20% em peso de proteínas solúveis e que todas as proteínas solúveis são enzimas. Calcule a concentração molar *média* de cada enzima nessa célula hipotética.

3. Aumento da velocidade pela urease. A enzima urease aumenta a velocidade de hidrólise da uréia em pH 8,0 e a 20°C de um fator de 10^{14}. Se uma dada quantidade de urease pode hidrolisar completamente uma dada quantidade de uréia em 5min a 20°C e pH 8,0, quanto tempo será necessário para que a mesma quantidade de uréia seja hidrolisada na ausência de urease? Suponha que ambas as reações ocorram em meios estéreis de tal forma que a uréia não possa ser atacada pela bactéria.

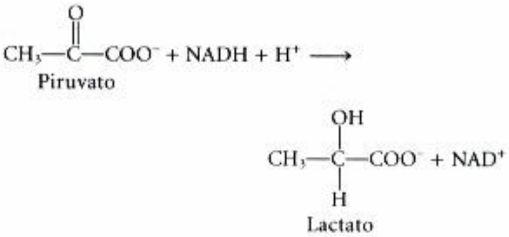
4. Proteção de uma enzima contra a desnaturação pelo calor. Quando uma solução de enzima é aquecida, ocorre uma progressiva perda de atividade catalítica com o tempo devido à desnaturação da enzima. Uma solução da enzima hexoquinase incubada a 45°C perde 50% de sua atividade em 12min. Entretanto, quando incubada a 45°C na presença de uma grande concentração de um de seus substratos, ela perde apenas 3% de sua atividade em 12min. Sugira por que a desnaturação térmica da hexoquinase foi retardada na presença de um dos seus substratos.

5. Requisitos dos sítios ativos de enzimas. A carboxipeptidase, que remove seqüencialmente os resíduos de aminoácidos, a partir da carboxila terminal, de seus substratos peptídicos é um polipeptídeo simples com 307 aminoácidos. Os dois grupos catalíticos essenciais no sítio ativo são Arg^{145} e Glu^{270}.

(a) Se a cadeia da carboxipeptidase fosse uma α-hélice perfeita, quão distantes (em Ångstrons) estariam Arg^{145} e Glu^{270}? (Sugestão: veja Fig. 6-4b.)

(b) Explique como dois aminoácidos separados por essa distância podem catalisar reação que ocorre em um espaço de poucos Ångstrons.

6. Ensaio quantitativo da desidrogenase láctica. A enzima desidrogenase láctica de músculo catalisa a reação:



$$CH_3{-}\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}{-}COO^- + NADH + H^+ \longrightarrow CH_3{-}\underset{\underset{\large H}{|}}{\overset{\overset{\large OH}{|}}{C}}{-}COO^- + NAD^+$$

Piruvato

Lactato

NADH e NAD^+ são as formas reduzida e oxidada, respectivamente, da coenzima NAD. Soluções de NADH, mas *não* de NAD^+, absorvem luz em 340nm. Essa propriedade é usada para determinar a concentração de NADH em solução por meio da medida espectrofotométrica da quantidade de luz absorvida em 340nm pela solução. Explique como essas propriedades do NADH podem ser usadas para a padronização de um ensaio quantitativo da desidrogenase láctica.

7. Relação entre a velocidade da reação e a concentração do substrato: equação de Michaelis-Menten. (a) Qual será a concentração do substrato no qual uma enzima com k_{cat} de $30s^{-1}$ e K_m de 0,005M apresenta uma velocidade um quarto da velocidade máxima? (b) Determine qual será a fração de $V_{máx}$ para as seguintes concentrações de substrato: $[S] = \frac{1}{2} K_m$, $2K_m$ e $10K_m$.

8. Estimação de $V_{máx}$ e K_m por inspeção. Embora existam métodos gráficos para a determinação precisa dos valores de $V_{máx}$ e K_m de uma reação catalisada enzimaticamente (veja Adendo 8-1), algumas vezes esses valores podem ser estimados rapidamente por inspeção dos valores de V_0 para concentrações crescentes de [S]. Estime os valores de $V_{máx}$ e K_m de uma reação enzimática em que foram obtidos os resultados apresentados a seguir.

[S] (M)	V_0 (μM/min)
$2,5 \times 10^{-6}$	28
$4,0 \times 10^{-6}$	40
1×10^{-5}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-3}	139
1×10^{-2}	140

9. Propriedades de uma enzima da síntese da prostaglandina. As prostaglandinas são uma classe de eicosanóides, derivados de ácidos graxos com uma variedade de ações extremamente potente, cuja estrutura e ação serão discutidas posteriormente nos Capítulos 11 e 21. As prostaglandinas são responsáveis pela produção da febre e inflamação e a dor associada a elas. Elas são derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo de 20 carbonos, por meio de uma reação catalisada pela prostaglandina endoperóxido sintase. Essa enzima, uma cicloxigenase, usa o oxigênio para converter o ácido araquidônico em PGG_2, o precursor imediato de muitas prostaglandinas diferentes (Capítulo 21).

(a) Os dados cinéticos que seguem são da reação catalisada pela prostaglandina endoperóxido sintase. Considerando-se apenas os valores das duas primeiras colunas, determine a $V_{máx}$ e o K_m da enzima.

[Ácido araquidônico] (mM)	Velocidade de formação do PGG_2 (mM/min)	Velocidade de formação do PGG_2 com 10mg/mL de ibuprofen (mM/min)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

(b) O ibuprofen é um inibidor da prostaglandina endoperóxido sintase. Inibindo a síntese das prostaglandinas, o ibuprofen reduz a inflamação e a dor. Usando os dados da primeira e terceira colunas da tabela, determine o tipo de inibição que o ibuprofen exerce sobre a prostaglandina endoperóxido sintase.

10. Análise gráfica de $V_{máx}$ e K_m. Os dados experimentais que seguem foram coletados durante um estudo da atividade catalítica de uma peptidase intestinal com o substrato glicilglicina:

$$\text{Glicilglicina} + H_2O \longrightarrow 2\ \text{glicina}$$

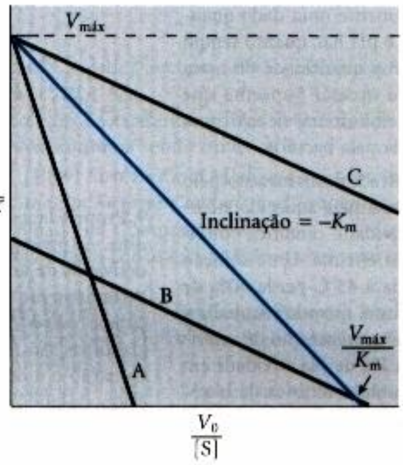
[S] (mM)	Produto formado (μmol/min)
1,5	0,21
2,0	0,24
3,0	0,28
4,0	0,33
8,0	0,40
16,0	0,45

Use a análise gráfica (ver Adendo 8-1) para determinar o K_m e a $V_{máx}$ para essa preparação de enzima e substrato.

11. A equação de Eadie-Hofstee. Uma transformação da equação de Michaelis-Menten é a equação de Lineweaver-Burk ou dos duplos recíprocos. Multiplicando-se ambos os termos da equação de Lineweaver-Burk por $V_{máx}$ e rearranjando-os, tem-se a equação de Eadie-Hofstee:

$$V_0 = (-K_m)\frac{V_0}{[S]} + V_{máx}$$

O gráfico de V_0 *versus* $V_0/[S]$ para uma reação enzimática é mostrado a seguir.



A reta azul foi obtida na ausência de inibidor. Qual a reta (A, B ou C) que mostra a atividade da enzima quando um inibidor competitivo é adicionado à mistura de reação?

12. O número de renovação da anidrase carbônica. A anidrase carbônica de eritrócitos (M_r 30.000) tem o maior número de renovação entre todas as enzimas conhecidas. Ela catalisa a hidratação reversível do CO_2:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Esse é um importante processo no transporte de CO_2 dos tecidos até os pulmões. Se 10µg de anidrase carbônica pura catalisam a hidratação de 0,3g de CO_2 em 1min a 37°C sob condições de $V_{máx}$, qual é o número de renovação (k_{cat}) da anidrase carbônica (em unidades de min^{-1})?

13. Derivando a equação da velocidade para uma inibição competitiva. A equação da velocidade para uma enzima sujeita a uma inibição competitiva é

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

Começando com uma nova definição de enzima total:

$$[E]_t = [E] + [EI] + [ES]$$

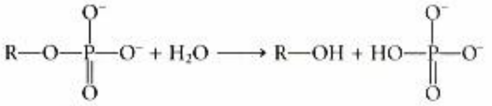
e as definições de α e K_I (veja Eq. 8-28), derive a equação da velocidade acima. Use a derivação da equação de Michaelis-Menten como exemplo.

14. Inibição irreversível de uma enzima. Muitas enzimas são inibidas irreversivelmente por íons de metais pesados como Hg^{2+}, Cu^{2+} ou Ag^+, que podem reagir com grupos sulfidrilas essenciais para formar mercaptídeos:

$$\text{Enz–SH} + Ag^+ \longrightarrow \text{Enz–S–Ag} + H^+$$

A afinidade dos íons Ag^+ pelos grupos sulfidrila é tão grande que esses íons podem ser usados para titular quantitativamente os grupos —SH. A 10mL de uma solução contendo 1mg/mL de uma enzima pura, um pesquisador adicionou $AgNO_3$ em uma quantidade suficiente para inativar completamente a enzima. Um total de 0,342µmol de $AgNO_3$ foi necessário. Calcule o peso molecular *mínimo* da enzima. Por que o valor obtido dessa maneira fornece apenas o peso molecular mínimo?

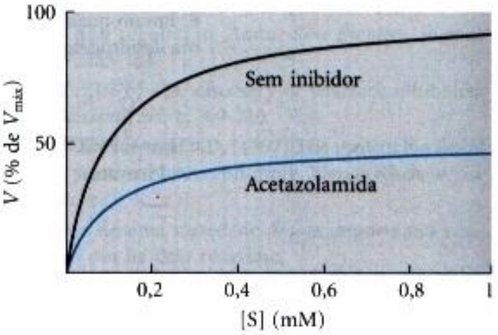
15. Aplicação clínica de inibição diferencial de enzimas. O soro humano contém uma classe de enzimas, as fosfatases ácidas, que hidrolisam ésteres de fosfato em condições levemente ácidas (pH 5,0):



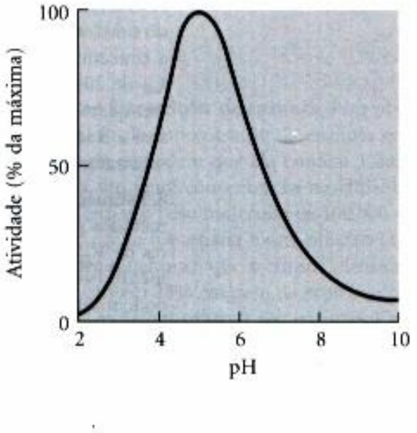
$$R{-}O{-}\overset{O^-}{\underset{O}{P}}{-}O^- + H_2O \longrightarrow R{-}OH + HO{-}\overset{O^-}{\underset{O}{P}}{-}O^-$$

As fosfatases ácidas são produzidas pelos eritrócitos, figado, rim, baço e próstata. A enzima da próstata é clinicamente importante porque o aumento da sua concentração no sangue é freqüentemente uma indicação de câncer da próstata. A fosfatase da próstata é fortemente inibida pelo íon tartarato, mas as fosfatases de outros tecidos não são. Como essa informação pode ser usada para desenvolver um procedimento específico para dosar a atividade da fosfatase ácida da próstata no soro sangüíneo humano?

16. Inibição da anidrase carbônica pela acetazolamida. A anidrase carbônica é fortemente inibida pela droga acetazolamida, que também é usada como diurético (para aumentar a secreção de urina) e para tratar o glaucoma (para reduzir a pressão excessivamente alta no olho, devido a um acúmulo de fluido intra-ocular). A anidrase carbônica desempenha um importante papel nesses e em outros processos de secreção porque ela participa na regulação do pH e do teor de bicarbonato em um grande número de fluidos do corpo. A curva experimental da velocidade inicial da reação (como porcentagem de $V_{máx}$) *versus* [S] para a reação catalisada pela anidrase carbônica é ilustrada a seguir. Quando o experimento é repetido na presença de acetazolamida, obtém-se a curva inferior. Por meio da inspeção das duas curvas e do seu conhecimento das propriedades cinéticas dos inibidores competitivos e mistos competitivos, determine a natureza da inibição provocada pela acetazolamida. Explique.



17. O pH ótimo da lisozima. O sítio ativo da lisozima contém dois resíduos de aminoácidos essenciais para a catálise: Glu^{35} e Asp^{52}. Os valores de pK_a das cadeias carboxílicas laterais desses dois resíduos são 5,9 e 4,5, respectivamente. Qual o estado de ionização (protonado ou não-protonado) de cada um desses resíduos em pH 5,2, o pH ótimo da lisozima? Como os estados de ionização desses dois resíduos de aminoácidos podem explicar o perfil pH-atividade da lisozima mostrado a seguir?



CAPÍTULO 9

Carboidratos e Glicoconjugados

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na face da Terra. A cada ano, a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas de CO_2 e H_2O em celulose e outros produtos vegetais. Certos carboidratos (açúcar comum e amido) são a base da dieta na maior parte do mundo e a oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica fornecedora de energia para a maioria das células não-fotossintéticas. Polímeros insolúveis de carboidratos funcionam tanto como elementos estruturais quanto de proteção nas paredes celulares bacterianas e de vegetais e nos tecidos conjuntivos de animais. Outros polímeros de carboidratos agem como lubrificantes das articulações esqueléticas e participam do reconhecimento e da coesão entre as células. Polímeros mais complexos de carboidratos, ligados covalentemente a proteínas ou lipídios, agem como sinais que determinam a localização intracelular ou o destino metabólico dessas moléculas híbridas, denominadas **glicoconjugados**. Este capítulo apresenta as principais classes de carboidratos e glicoconjugados e fornece alguns exemplos de seus variados papéis estruturais e funcionais.

Os carboidratos são, predominantemente, poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas cíclicos, ou substâncias que liberam esses compostos por hidrólise. Muitos carboidratos, mas não todos, têm fórmulas empíricas $(CH_2O)_n$; alguns também contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre.

Os carboidratos estão divididos em três classes principais, de acordo com o seu tamanho: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (a palavra "sacarídeo" é derivada do grego *sakcharon* que significa "açúcar"). Os **monossacarídeos**, ou açúcares simples, consistem em uma única unidade de poliidroxialdeído ou cetona. O monossacarídeo mais abundante na natureza é o açúcar com seis átomos de carbono na molécula, a D-glicose, também chamada dextrose.

Os **oligossacarídeos** são compostos por cadeias curtas de unidades monossacarídicas, unidas entre si por ligações características, chamadas ligações glicosídicas. Os mais abundantes são os **dissacarídeos**, formados por duas unidades de monossacarídeos. A sacarose, ou açúcar de cana, é o representante típico dessa classe. Ela é composta de dois monossacarídeos, com seis átomos de carbono, D-glicose e D-frutose. Todos os monossacarídeos e dissacarídeos comuns têm nomes que terminam com o sufixo "-ose". Nas células, a maioria dos oligossacarídeos com três ou mais unidades não ocorre como entidades livres, mas é unida a moléculas de não-açúcares (lipídios ou proteínas), formando glicoconjugados.

Os polímeros de açúcares têm uma variação progressiva de tamanho de cadeia. Aqueles que contêm mais de 20 unidades são chamados **polissacarídeos**. Os polissacarídeos podem ter cadeias contendo centenas ou milhares de unidades monossacarídicas. Alguns, como a celulose, têm cadeias lineares, enquanto outros, como o glicogênio, têm cadeias ramificadas. Os polissacarídeos de origem vegetal, amido e celulose, consistem em unidades repetitivas de D-glicose, mas diferem entre si no tipo de ligação glicosídica, conseqüentemente têm propriedades e funções biológicas diferentes.

Algodão pronto para a colheita. A fibra do algodão é formada de celulose, um polissacarídeo com propriedades físico-químicas que lhe dão as características têxtil desejáveis. O algodão tem sido cultivado e usado em produtos têxteis há milhares de anos.

Monossacarídeos e Dissacarídeos

Os carboidratos mais simples, os monossacarídeos, são aldeídos ou cetonas que contêm um ou mais grupos hidroxila na molécula; os monossacarídeos com seis átomos de carbono, glicose e frutose, têm cinco grupos hidroxila. Os átomos de carbono, nos quais os grupos hidroxila estão ligados, são geralmente centros quirais, os quais originam os numerosos açúcares estereoisômeros encontrados na natureza. Iniciaremos descrevendo as famílias de monossacarídeos com esqueletos de três a sete átomos de carbono — suas estruturas e suas formas estereoisoméricas — e as maneiras de representar suas estruturas tridimensionais sobre o papel. Discutiremos, então, as diversas reações químicas dos grupos carbonila dos monossacarídeos. Uma dessas reações é a adição de um grupo hidroxila da mesma molécula, que produz as formas cíclicas dos açúcares de cinco e seis átomos de carbono (as quais predominam em solução aquosa) e cria um novo centro quiral, aumentando o grau de complexidade estereoquímica dessa classe de compostos. A nomenclatura que especifica, de maneira não ambígua, a configuração ao redor de cada átomo de carbono na forma cíclica e a forma de representar essas estruturas no papel estão descritas com alguns detalhes a seguir; isso será muito útil mais tarde, quando da discussão do metabolismo dos monossacarídeos.

Apresentaremos aqui também alguns importantes derivados de monossacarídeos, que serão encontrados nos capítulos seguintes.

As duas famílias de monossacarídeos: aldoses e cetoses

Os monossacarídeos são compostos incolores, sólidos cristalinos, naturalmente solúveis em água, porém insolúveis nos solventes não-polares. A maior parte deles tem sabor doce. O esqueleto molecular dos monossacarídeos comuns é constituído por uma cadeia carbônica não-ramificada na qual todos os átomos de carbono estão unidos entre si por ligações covalentes simples. Na forma de cadeia aberta, um dos átomos de carbono é unido por uma ligação dupla a um átomo de oxigênio para formar um grupo carbonila; cada um dos outros átomos de carbono tem um grupo hidroxila. Se o grupo carbonila está em uma das extremidades da cadeia carbônica (isto é, em um aldeído), o monossacarídeo é uma **aldose**; se o grupo carbonila está em qualquer outra posição (em uma cetona), o monossacarídeo é uma **cetose**. Os monossacarídeos mais simples são as duas trioses com três átomos de carbono: o gliceraldeído, uma aldotriose, e a diidroxiacetona, uma cetotriose (Fig. 9-1a).

Os monossacarídeos com quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono em seus esqueletos moleculares são chamados, respectivamente, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses. Existem aldoses e cetoses correspondentes a cada um desses comprimentos de cadeia: aldotetroses e cetotetroses, aldopentoses e cetopentoses, e assim por diante. As hexoses, que incluem a aldoexose D-glicose e a cetoexose D-frutose (Fig. 9-1b), são os monossacarídeos mais comuns na natureza. As aldopentoses D-ribose e 2-desoxi-D-ribose (Fig. 9-1c) são componentes dos nucleotídeos e dos ácidos nucléicos (Capítulo 10).

Os monossacarídeos possuem centros assimétricos

Todos os monossacarídeos, exceto a diidroxiacetona, contêm um ou mais átomos de carbono assimétrico (quiral) e, assim, ocorrem em formas isoméricas opticamente ativas (págs. 45-47). A aldose mais simples, o gliceraldeído, contém um centro quiral (o átomo de carbono central); portanto, tem dois isômeros ópticos diferentes, ou enantiômeros (Fig. 9-2). Por convenção, uma dessas duas formas é designada isômero D e a outra isômero L.

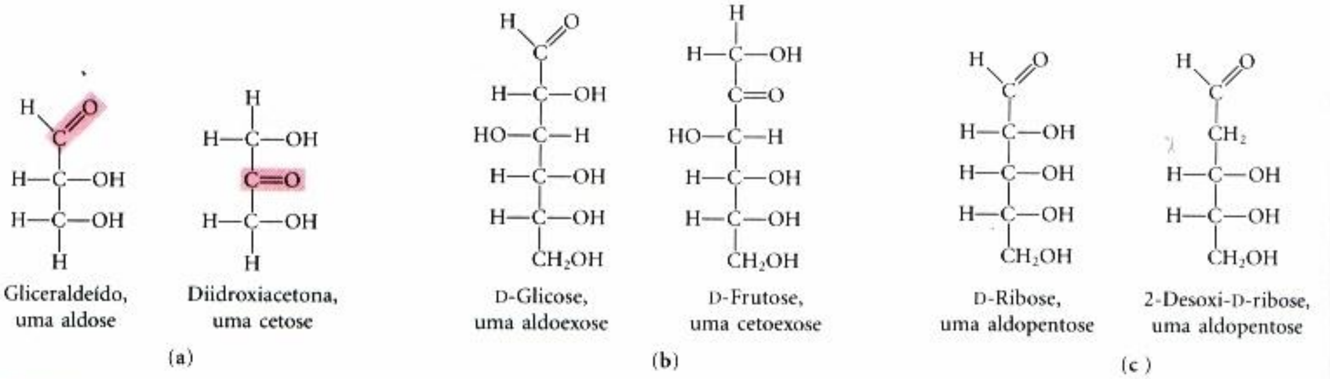

Gliceraldeído, uma aldose — Diidroxiacetona, uma cetose (a)
D-Glicose, uma aldoexose — D-Frutose, uma cetoexose (b)
D-Ribose, uma aldopentose — 2-Desoxi-D-ribose, uma aldopentose (c)

Figura 9-1 – Monossacarídeos representativos. (**a**) Duas trioses, uma aldose e uma cetose. O grupo carbonila está sombreado em vermelho em cada uma das estruturas. (**b**) Duas hexoses comuns. (**c**) As pentoses componentes dos ácidos nucléicos. A D-ribose é componente do ácido ribonucléico (RNA) e a 2-desoxi-D-ribose é componente do ácido desoxirribonucléico (DNA).

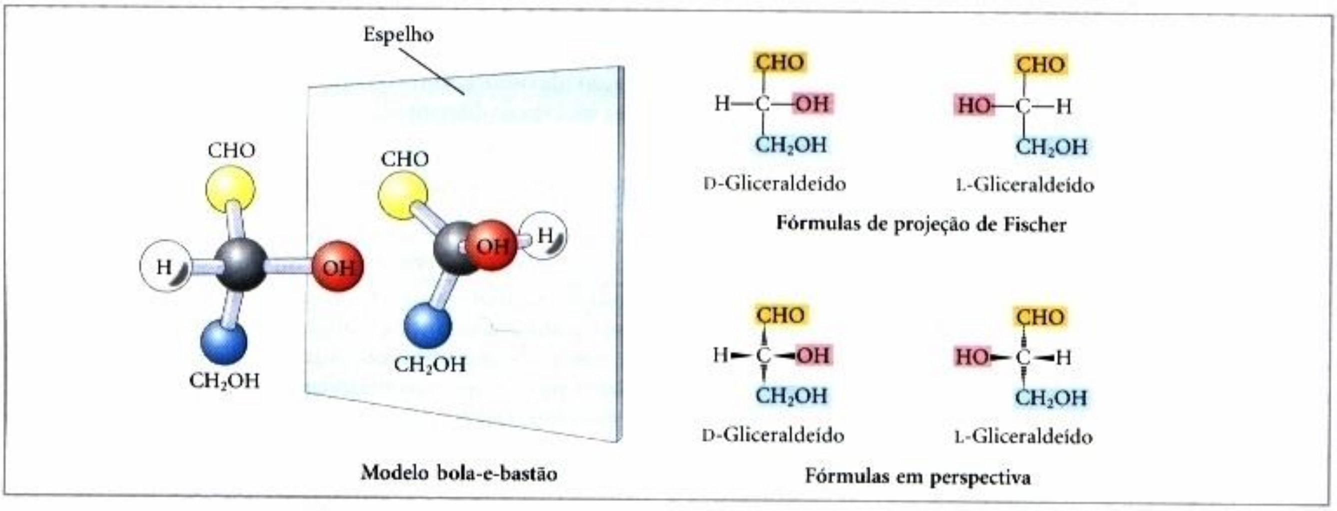
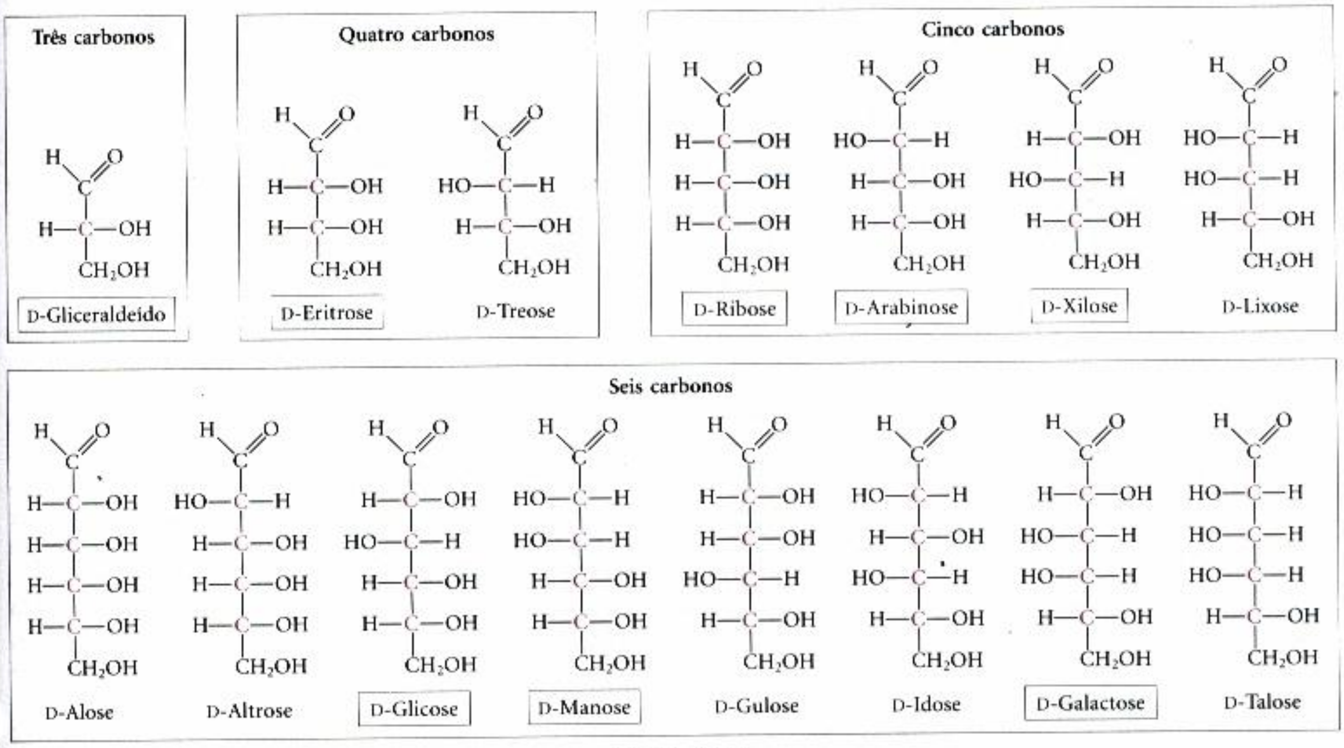


Figura 9-2 – Três maneiras de representar os dois isômeros do gliceraldeído. Os estereoisômeros são imagens especulares um do outro. O modelo bola-e-bastão mostra a configuração real das moléculas. Por convenção, na fórmula de projeção de Fischer, as ligações horizontais são projetadas para a frente do plano do papel, as ligações verticais para a parte de trás do plano do papel. Relembrando (veja Fig. 3-7) que, nas fórmulas em perspectiva, as ligações em forma de cunha se projetam para a frente do plano do papel e as pontilhadas para trás do plano do papel.

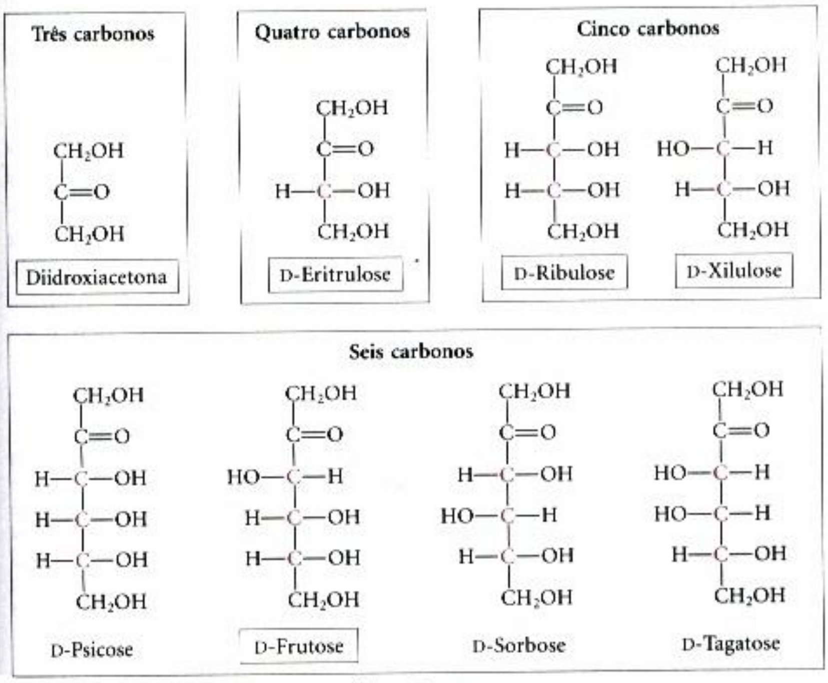
Como para outras biomoléculas com centros quirais, as configurações absolutas dos açúcares são conhecidas por cristalografia de raios X. Para representar a estrutura dos açúcares de maneira tridimensional no papel, empregamos correntemente as **fórmulas de projeção de Fischer** (Fig. 9-2).

Em geral, uma molécula com *n* centros quirais pode ter 2^n estereoisômeros. O gliceraldeído tem $2^1 = 2$; as aldoexoses, com quatro centros quirais, têm $2^4 = 16$ estereoisômeros. Os estereoisômeros dos monossacarídeos de cada um dos comprimentos de cadeia carbônica podem ser divididos em dois grupos que diferem na configuração ao redor do centro quiral *mais distante* do carbono da carbonila. Aqueles em que a configuração desse átomo de carbono de referência é a mesma do D-gliceraldeído são designados de isômeros D, e aqueles com a mesma configuração do L-gliceraldeído são os isômeros L. Quando o grupo hidroxila no carbono de referência está do lado direito na fórmula de projeção, o açúcar é o D-isômero; quando ele está à esquerda, é o L-isômero. Das 16 aldoexoses possíveis, oito são da forma D e oito são da forma L. As hexoses encontradas nos organismos vivos são, na maioria, D-isômeros.

A Figura 9-3 mostra as estruturas dos D-estereoisômeros de todas as aldoses e as cetoses que possuem de três a seis átomos de carbono. Os átomos de carbono de um açúcar são numerados começando-se pela extremidade da cadeia mais próxima do gru-


Três carbonos
D-Gliceraldeído
Quatro carbonos
D-Eritrose
D-Treose
Cinco carbonos
D-Ribose
D-Arabinose
D-Xilose
D-Lixose
Seis carbonos
D-Alose
D-Altrose
D-Glicose
D-Manose
D-Gulose
D-Idose
D-Galactose
D-Talose

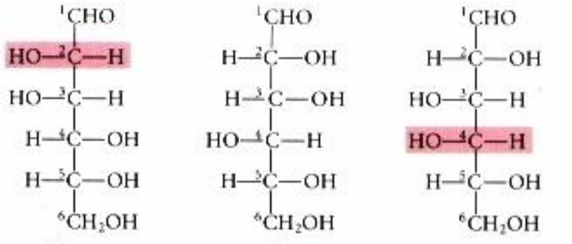
(a) D-Aldoses


Três carbonos
Diidroxiacetona
Quatro carbonos
D-Eritrulose
Cinco carbonos
D-Ribulose
D-Xilulose
Seis carbonos
D-Psicose
D-Frutose
D-Sorbose
D-Tagatose

(b) D-Cetoses

Figura 9-3 – As séries das (**a**) D-aldoses e (**b**) D-cetoses que têm de três a seis átomos de carbono são mostradas em suas fórmulas de projeção. Os átomos de carbono em vermelho são centros quirais. Em todos esses D-isômeros o carbono quiral *mais distante do carbono da carbonila* tem a mesma configuração que o carbono quiral do D-gliceraldeído. Os açúcares, cujos nomes estão dentro de retângulos, são aqueles mais abundantes na natureza; voltaremos a encontrá-los neste e nos próximos capítulos.

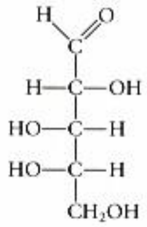
po carbonila. Cada uma das oito D-aldoexoses, as quais diferem estereoquimicamente em C-2, C-3 e C-4, têm nomes próprios: D-glicose, D-galactose, D-manose, etc. (Fig. 9-3a). As cetoses de quatro e cinco átomos de carbono são designadas pela inserção de "ul" no nome da aldose correspondente; por exemplo: D-ribulose é a cetopentose correspondente à aldopentose D-ribose. Entretanto, existem cetoexoses que são denominadas contrariando essa regra como a frutose (do latim *fructus*, que significa "fruta"; as frutas são ricas nesse açúcar) e a sorbose (de *Sorbus*, gênero de árvore de montanha, a qual tem frutas que são ricas em sorbitol, um álcool derivado de açúcar). Dois açúcares que diferem somente na configuração ao redor de um único átomo de carbono são chamados **epímeros**; a D-glicose e a D-manose, que diferem estereoquimicamente apenas em C-2, são epímeros, como também o são a D-glicose e a D-galactose (as quais diferem em C-4) (Fig. 9-4).



D-Manose (epímero em C-2) D-Glicose D-Galactose (epímero em C-4)

Figura 9-4 – Epímeros. A D-glicose e dois de seus epímeros são mostrados em fórmulas de projeção. Cada epímero difere da D-glicose na configuração de apenas um centro quiral (sombreado em vermelho).

Alguns açúcares ocorrem naturalmente na forma L; exemplos são a L-arabinose e os L-isômeros de alguns derivados de açúcares (discutidos a seguir), componentes comuns dos glicoconjugados.



L-Arabinose

Os monossacarídeos comuns possuem estruturas cíclicas

Para simplificar, representamos as estruturas das várias aldoses e cetoses em forma de cadeia linear (Figs. 9-3 e 9-4). Na realidade, em soluções aquosas, as aldotetroses e todos os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono na cadeia ocorrem, predominantemente, como estruturas cíclicas (anel) nas quais o grupo carbonila forma uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila ao longo da cadeia. A formação dessas estruturas em anel é resultado da reação geral entre aldeídos ou cetonas e álcoois, formando derivados chamados **hemiacetais ou hemicetais** (Fig. 9-5), que apresentam um carbono assimétrico adicional e assim podem existir em duas formas estereoisoméricas. Por exemplo: a D-glicose existe, em solução, como um hemiacetal intramolecular, no qual a hidroxila livre em C-5 reagiu com C-1 da função aldeído, formando um novo centro assimétrico e produzindo dois estereoisômeros, chamados α e β (Fig. 9-6). Esses anéis de seis elementos são conhecidos por **piranoses**, porque eles se assemelham ao anel de seis elementos do pirano (Fig. 9-7). A nomenclatura sistemática para os dois anéis da D-glicose são α-D-**glicopiranose** e β-D-glicopiranose.

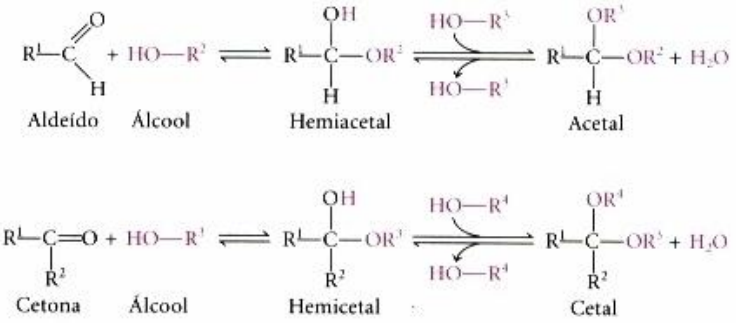
As aldoexoses também existem em formas cíclicas com anéis de cinco átomos, as quais, devido à semelhança com o composto cíclico furano que possui estrutura química com cinco átomos em anel, são chamadas **furanoses**. Entretanto, o anel de seis átomos aldopiranosídico é muito mais estável que o anel aldofuranosídico e predomina nas soluções de aldoexoses. Apenas aldoses contendo cinco ou mais átomos de carbono podem formar anéis piranosídicos.

As formas isoméricas dos monossacarídeos, que diferem uma da outra apenas em sua configuração ao redor do átomo de carbono do hemiacetal ou hemicetal, são chamadas **anômeros**. O átomo de carbono da carbonila ou hemiacetal é chamado de **carbono anomérico**. Os anômeros α e β da D-glicose interconvertem-se, quando em solução aquosa, por meio de um processo chamado **mutarrotação**. Assim, uma solução que inicialmente contém apenas α-D-glicose e uma outra solução que contém apenas β-D-glicose formarão, quando atingirem o equilíbrio, misturas idênticas, exibindo propriedades ópticas idênticas. Essa mistura consiste de aproximadamente um terço de α-D-glicose, dois terços de β-D-glicose e quantidades muito pequenas da forma linear e de anel de cinco carbonos (glicofuranose).

As cetoexoses também ocorrem nas formas anoméricas α e β. Nesses compostos, o grupo hidroxila em C-5 (ou C-6) reage com o cetogrupo em C-2, formando um anel furanosídico (ou piranosídico) contendo uma ligação hemicetal (Fig. 9-5). A D-frutose forma predominantemente um anel furanosídico (Fig. 9-7); sendo que o anômero mais comum, em formas combinadas ou derivadas, é a β-D-frutofuranose.

As **fórmulas em perspectivas de Haworth**, como aquelas na Figura 9-7, são comumente usadas para mostrar a forma em anel dos monossacarídeos. Porém, o anel piranosídico com seis átomos não é plano, como a perspectiva de Haworth sugere, mas tende a assumir uma das duas conformações em "cadeira" (Fig. 9-8).

Figura 9-5 – Formação de hemiacetais e hemicetais. Um aldeído ou uma cetona pode reagir com um álcool, na proporção 1:1, produzindo um hemiacetal ou um hemicetal, respectivamente, criando um novo centro quiral no carbono da carbonila. A substituição de uma segunda molécula de álcool produz um acetal ou cetal. Quando o segundo álcool faz parte de uma outra molécula de açúcar, forma-se a ligação glicosídica (pág. 231).


R¹—C(=O)H + HO—R² ⇌ R¹—C(OH)(H)—OR² ⇌ R¹—C(OR³)(H)—OR² + H₂O
HO—R³
HO—R³
Aldeído
Álcool
Hemiacetal
Acetal
R¹—C(R²)=O + HO—R³ ⇌ R¹—C(OH)(R²)—OR³ ⇌ R¹—C(OR⁴)(R²)—OR³ + H₂O
HO—R⁴
HO—R⁴
Cetona
Álcool
Hemicetal
Cetal

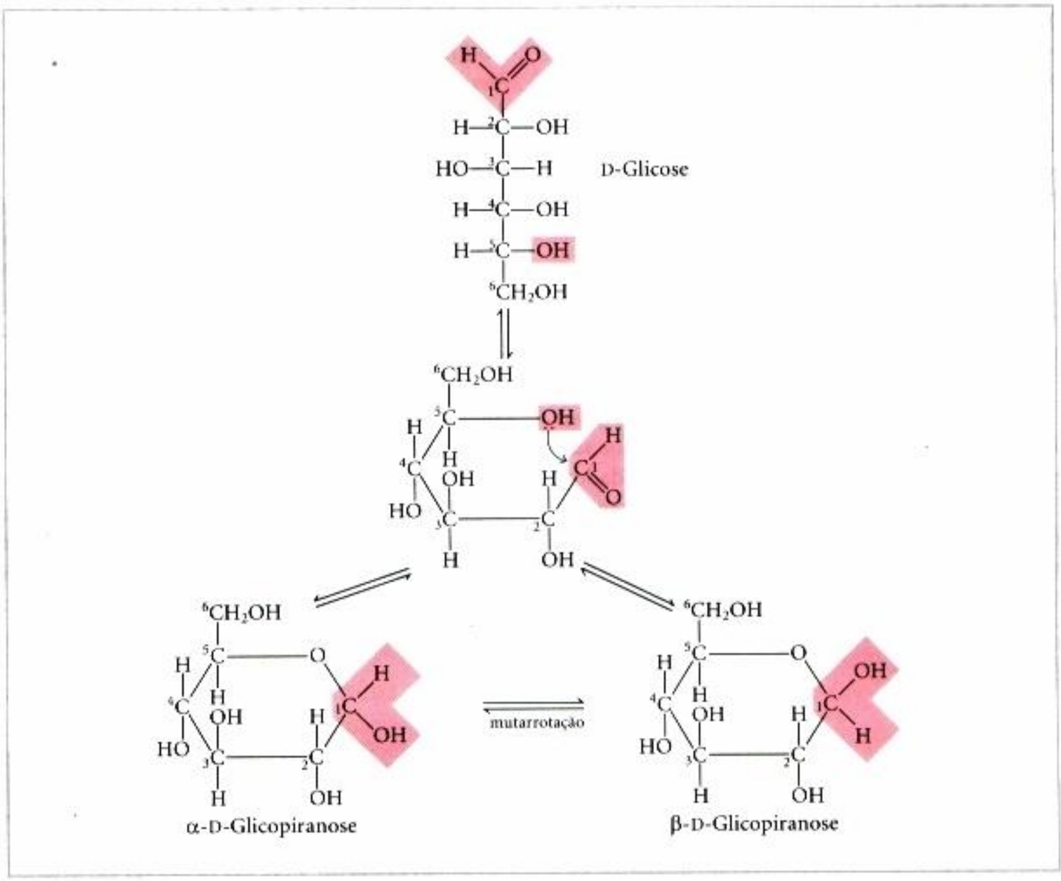
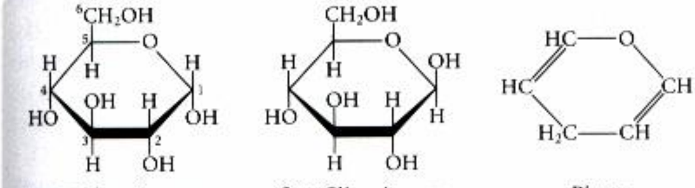


Figura 9-6 – Formação das duas estruturas cíclicas da D-glicose. A reação entre o grupo aldeído em C-1 e o grupo hidroxila em C-5 forma uma ligação hemiacetal, gerando dois estereoisômeros, os anômeros α e β, que diferem somente na estereoquímica em torno do carbono do hemiacetal. A interconversão dos anômeros α e β é chamada mutarrotação.


α-D-Glicopiranose β-D-Glicopiranose Pirano

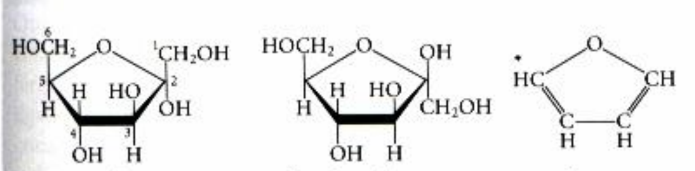
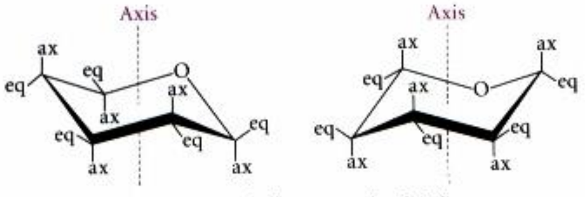
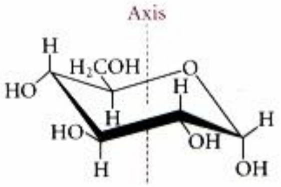

α-D-Frutofuranose β-D-Frutofuranose Furano

Figura 9-7 – Piranoses e furanoses. As formas piranosídicas da D-glicose e as formas furanosídicas da D-frutose são mostradas aqui nas fórmulas em perspectiva de Haworth. As bordas do anel mais próximas do leitor estão representadas por linhas grossas. Na perspectiva de Haworth, os grupos hidroxila que estão abaixo do plano do anel devem estar do lado direito nas fórmulas de projeção de Fischer (compare com a Fig. 9-6). O pirano e o furano são mostrados para comparação.



Duas possíveis formas em "cadeira"
(a)



α-D-Glicopiranose
(b)

Figura 9-8 – Fórmulas conformacionais das piranoses. (**a**) Duas formas em "cadeira" do anel piranosídico. Os substituintes nos carbonos do anel podem ser axiais (ax), projetando-se paralelos com o eixo vertical em relação ao plano do anel, ou, então, equatoriais (eq), projetando-se de maneira quase perpendicular ao mesmo eixo. Geralmente os substituintes nas posições equatoriais sofrem menos impedimento estérico por substituintes vizinhos; portanto, as conformações com substituintes volumosos na posição equatorial são favorecidas. Uma outra conformação em "barco" (não mostrada) somente aparece em derivados com substituintes muito volumosos. (**b**) A conformação em "cadeira" da α-D-glicopiranose.

Lembre-se de que no Capítulo 3 foi explicado que duas *conformações* de uma molécula são interconversíveis sem a quebra de ligação covalente, porém duas *configurações* podem ser interconvertidas apenas pela quebra de ligações covalentes — por exemplo, no caso das configurações α e β, a ligação que necessita ser rompida é aquela que envolve o átomo de oxigênio do anel. As conformações tridimensionais específicas das unidades de monossacarídeos são importantes na determinação das propriedades biológicas e funções de alguns polissacarídeos, como veremos mais adiante.

Os organismos contêm uma variedade de derivados das hexoses

Em adição às hexoses simples como a glicose, a galactose e a manose existe um grande número de seus derivados, nos quais um grupo hidroxila no composto original é trocado por um outro grupo substituinte, ou um átomo de carbono é oxidado a ácido carboxílico (Fig. 9-9). Na glucosamina, na galactosamina e na manosamina, a hidroxila em C-2 do açúcar original é substituída por um grupo amino. O grupo amino quase sempre está condensado com o ácido acético, como na *N*-acetilglucosamina. Esse derivado da glucosamina é parte de muitos polímeros estruturais, incluindo aqueles das paredes celulares de bactérias. As paredes celulares bacterianas contêm também um derivado da glucosamina chamado ácido *N*-acetilmurâmico, no qual o ácido láctico (ácido carboxílico com três átomos de carbono) está unido por uma ligação éter ao oxigênio em C-3 da *N*-acetilglucosamina. A substituição de um grupo hidroxila por um hidrogênio em C-6 da L-galactose ou da L-manose produz L-fucose ou L-ramnose, respectivamente; esses desoxiaçúcares são encontrados em polissacarídeos de plantas e oligossacarídeos complexos componentes de glicoproteínas e glicolipídios que serão descritos mais adiante.

Quando o carbono da carbonila (aldeído) da glicose é oxidado até ácido carboxílico, é produzido o ácido glucônico; outras aldoses produzem outros **ácidos aldônicos**. A oxidação do carbono na outra extremidade da cadeia carbônica (C-6 da glicose, galactose ou manose) forma os **ácidos urônicos** correspondentes: ácidos glucurônico, galacturônico e manurônico. Ambos os grupos de ácidos urônicos e aldônicos formam ésteres intramoleculares estáveis chamados lactonas (Fig. 9-9; abaixo e

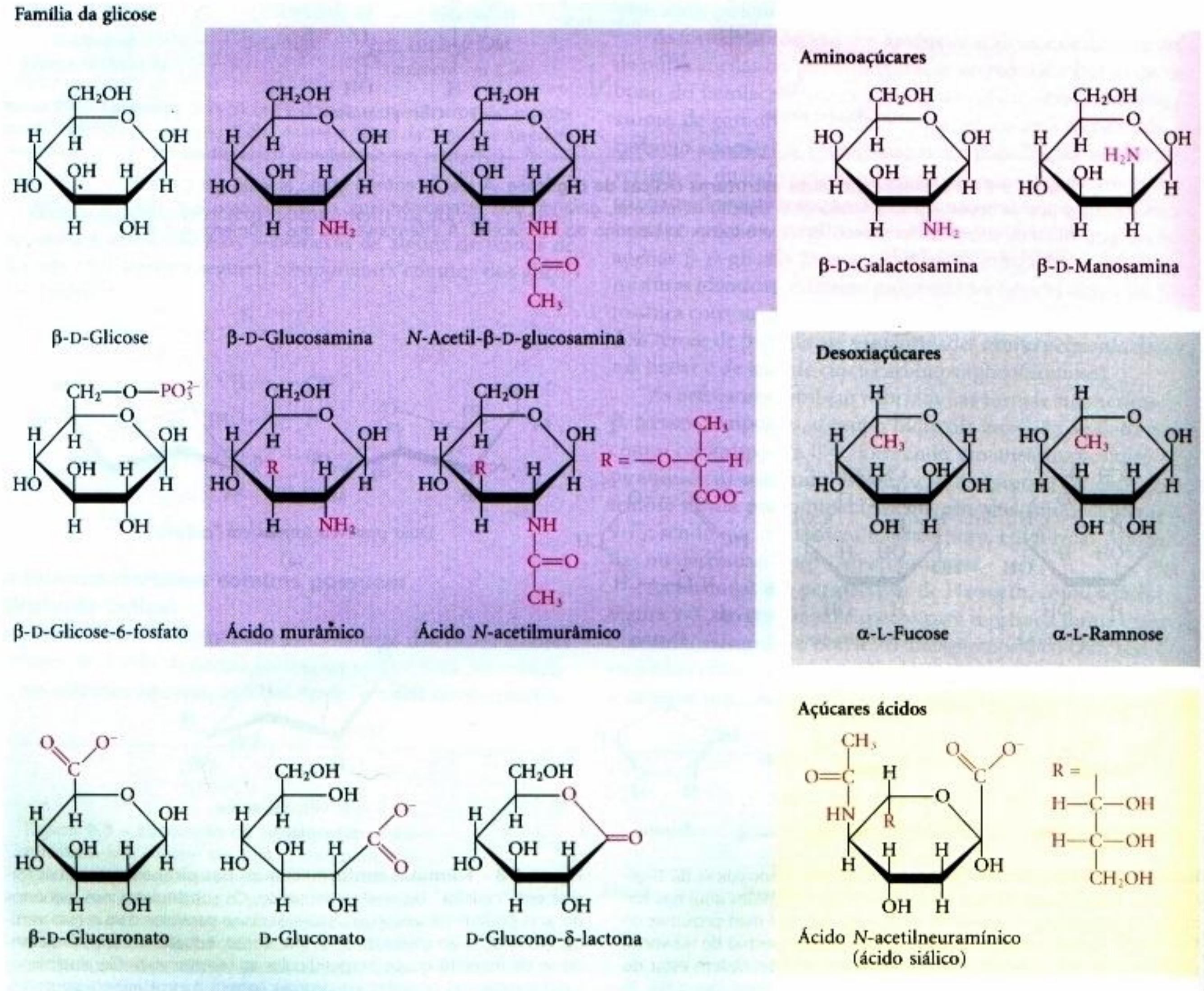

Família da glicose
β-D-Glicose
β-D-Glucosamina
N-Acetil-β-D-glucosamina
Aminoaçúcares
β-D-Galactosamina
β-D-Manosamina
β-D-Glicose-6-fosfato
Ácido murâmico
Ácido N-acetilmurâmico
R = —O—C—H (CH₃, COO⁻)
Desoxiaçúcares
α-L-Fucose
α-L-Ramnose
Açúcares ácidos
β-D-Glucuronato
D-Gluconato
D-Glucono-δ-lactona
Ácido N-acetilneuramínico
(ácido siálico)
R = H—C—OH, H—C—OH, CH₂OH

Figura 9-9 – Alguns derivados das hexoses importantes em biologia. Nos aminoaçúcares, um grupo —NH_2 substitui um grupo —OH da hexose original. A substituição de —OH por —H produz um desoxiaçúcar. Note que os desoxiaçúcares mostrados aqui ocorrem na natureza como os isômeros L. Os açúcares ácidos contêm um grupo carboxilato, o qual lhes confere uma carga negativa em pH neutro. A D-glucono-δ-lactona resulta da formação de uma ligação éster entre o grupo carboxilato em C-1 e o grupo hidroxila em C-5 (também conhecido como carbono δ) do D-gluconato.

à esquerda). Além desses derivados ácidos das hexoses, um açúcar ácido com nove átomos de carbono merece menção: o ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico), um derivado da *N*-acetilmanosamina, é um dos componentes de muitas glicoproteínas e glicolipídios de origem animal. Os grupos carboxila desses derivados de açúcar estão ionizados em pH 7, e esses compostos são, portanto, corretamente nomeados de carboxilatos, por exemplo, glucuronato, galacturonato, e assim por diante.

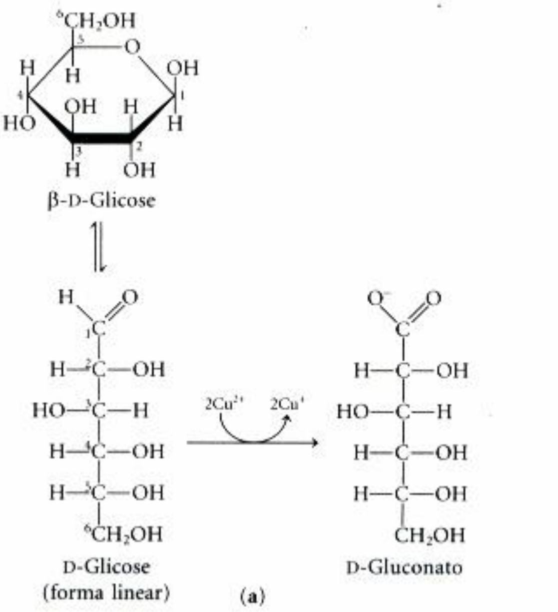
Durante a síntese e a degradação metabólica dos carboidratos, freqüentemente os intermediários não são os próprios açúcares, mas os seus derivados fosforilados. A condensação do ácido fosfórico com um dos grupos hidroxila de um açúcar forma um éster fosfórico, como na glicose-6-fosfato (Fig. 9-9). Os açúcares fosfatados são relativamente estáveis em pH neutro e possuem uma carga negativa. Um dos efeitos da fosforilação do açúcar no interior das células é impedir a difusão desse açúcar para fora dela; a membrana plasmática das células, em geral, não possui um transportador específico para essas moléculas. A fosforilação também ativa os açúcares para as transformações químicas subseqüentes. Vários derivados fosforilados importantes dos açúcares serão discutidos no próximo capítulo.

Os monossacarídeos são agentes redutores

Os monossacarídeos podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves, tais como os íons férrico (Fe^{3+}) e cúprico (Cu^{2+}) (Fig. 9-10a). O carbono do grupo carbonila é oxidado a carboxila. A glicose e outros açúcares capazes de reduzir os íons férrico ou cúprico são chamados de **açúcares redutores**. Essa propriedade é a base da reação de Fehling, um teste qualitativo para a presença de açúcares redutores. É também possível determinar a concentração de um açúcar redutor pela medida da quantidade de agente oxidante que é reduzido pela solução desse mesmo açúcar. Por muitos anos, esse teste foi usado para detectar e medir as elevações dos níveis de glicose no sangue e na urina no diagnóstico do diabetes melito. Atualmente, métodos mais sensíveis para a medida da glicose sangüínea empregam uma enzima, a glicose oxidase (Fig. 9-10b).

Os dissacarídeos contêm uma ligação glicosídica

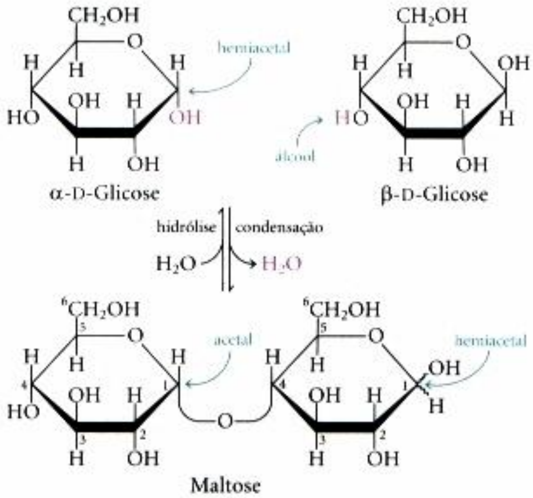
Os dissacarídeos (como a maltose, a lactose e a sacarose) são constituídos por dois monossacarídeos unidos covalentemente entre si por uma **ligação *O*-glicosídica**, a qual é formada quando um grupo hidroxila de um molécula de açúcar reage com o átomo de carbono anomérico da outra molécula de açúcar (Fig. 9-11). Essa reação representa a formação de um acetal a partir de um hemiacetal (como a glicopiranose) e de um álcool (um grupo hidroxila de uma segunda molécula de açúcar) (Fig. 9-5). Quando um carbono anomérico participa de uma ligação glicosídica, ele não pode mais ser oxidado por um íon cúprico ou férrico. Esse açúcar contendo o átomo de carbono anomérico ligado não pode existir na forma linear e não pode mais agir como um açúcar redutor. Na descrição dos dissacarídeos ou polissacarídeos, a extremidade de uma cadeia que tem um carbono anomérico livre (isto é, não envolvido em uma ligação glicosídica) é comumente chamada de **extremidade redutora** da cadeia. As ligações glicosídicas são facilmente hidrolisadas por ácido, mas resistem à clivagem por base. Assim, os dissacarídeos podem ser hidrolisados para liberar os seus componentes monossacarídicos livres por aquecimento com ácido diluído. Um outro tipo de ligação glicosídica reúne o átomo de carbono anomérico de um açúcar a um átomo de nitrogênio em uma glicoproteína (veja Fig. 9-25). Essas ligações *N*-glicosil são também encontradas em todos os nucleotídeos (Capítulo 10).



$$\text{D-Glicose} + O_2 \xrightarrow{\text{glicose oxidase}} \text{D-Glucono-}\delta\text{-lactona} + H_2O_2$$

(b)

Figura 9-10 – Açúcares como agentes redutores. (**a**) A oxidação do carbono anomérico da glicose e outros açúcares é a base da reação de Fehling: o íon cuproso (Cu^+) produzido em condições alcalinas forma o óxido cuproso que é um precipitado vermelho. Na forma hemiacetal (em anel), o C-1 da glicose não pode ser oxidado pelo Cu^{2+}. Entretanto, a forma em cadeia aberta está em equilíbrio com a forma em anel e, eventualmente, a reação de oxidação chega a ser completa. A reação com Cu^{2+} não é tão simples como a equação aqui apresentada; além do D-gluconato, vários ácidos de cadeia curta são produzidos pela fragmentação da glicose. (**b**) A concentração da glicose sangüínea é comumente determinada pela medida da quantidade de H_2O_2 produzida pela reação catalisada pela glicose oxidase. Na mistura reacional, uma segunda enzima, a peroxidase, catalisa a reação da H_2O_2 com um composto incolor para produzir um componente corado, cuja quantidade é, então, medida por espectrofotometria.



Maltose
α-D-glicopiranosil-(1→4)-D-glicopiranose

Figura 9-11 – Formação da maltose. Um dissacarídeo é formado a partir de dois monossacarídeos (no caso desta figura, duas moléculas de D-glicose) quando uma —OH (álcool) da molécula de glicose (à direita) se condensa com o hemiacetal intramolecular de outra molécula de glicose (à esquerda), com a eliminação de H_2O e a formação de uma ligação *O*-glicosídica. O reverso dessa reação é a hidrólise, ataque da ligação glicosídica pela H_2O. A molécula da maltose retém um hemiacetal redutor em C-1, não envolvido na ligação glicosídica. Assim sendo, a mutarrotação interconverte as formas α em β do hemiacetal. As ligações nessa posição, algumas vezes, são representadas por linhas onduladas para indicar que a estrutura pode ser tanto α quanto β.

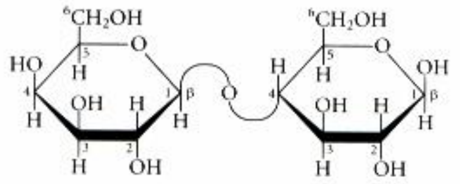
A maltose, um dissacarídeo (Fig. 9-11), contém duas unidades de D-glicose unidas por uma ligação glicosídica entre C-1 (o carbono anomérico) de uma unidade de glicose e C-4 da outra. Devido ao fato de o carbono anomérico livre (C-1 da unidade de glicose à direita da Fig. 9-11) poder ser oxidado, a maltose é um dissacarídeo redutor. A configuração do átomo de carbono anomérico envolvido na ligação glicosídica é α. A unidade de glicose com o carbono anomérico livre é capaz de existir nas formas α e β-piranosídicas.

Várias regras devem ser seguidas para nomear os dissacarídeos, como a maltose, de forma clara e precisa, e especialmente para designar os oligossacarídeos mais complexos. Por convenção, o nome descreve o composto a partir de seu terminal não-redutor colocado à esquerda, sendo, então, "construído" na seguinte ordem: (1) A configuração (α ou β) do átomo de carbono anomérico que reúne a primeira unidade de monossacarídeo (à esquerda) à segunda é escrita. (2) É escrito o nome da unidade da extremidade não-redutora. Para distinguir as estruturas dos anéis, cinco ou seis átomos, adiciona-se ao nome os termos "furano" ou "pirano". (3) Os dois átomos de carbono reunidos pela ligação glicosídica são indicados entre parênteses, com uma seta conectando os dois números; por exemplo (1→4) mostra que C-1 da primeira unidade de açúcar está unido ao C-4 da segunda. (4) Escreve-se o nome da segunda unidade. Se existir uma terceira unidade, a segunda ligação glicosídica é descrita por meio das mesmas convenções. Para encurtar a descrição de polissacarídeos complexos são freqüentemente empregadas abreviações de três letras para cada monossacarídeo, como apresentado na Tabela 9-1. Seguindo essa convenção para denominar oligossacarídeos, a maltose será nomeada α-D-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranose. Como a maioria dos açúcares encontrada neste livro é enantiômeros D e predomina a forma piranosídica das hexoses, usamos geralmente a versão curta do nome formal desses compostos, dando a configuração do carbono anomérico e nomeando os carbonos unidos pela ligação glicosídica. Nessa nomenclatura abreviada, a maltose é nomeada Glc(α1→4)Glc.

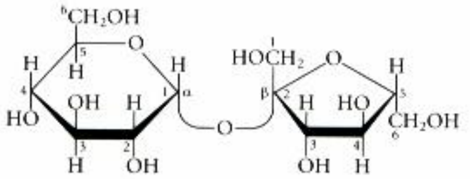
Tabela 9-1 – Abreviações para os monossacarídeos comuns e alguns de seus derivados

Nome	Abreviação	Nome	Abreviação
Abequose	Abe	Ácido glucurônico	GlcA
Arabinose	Ara	Galactosamina	GalN
Frutose	Fru	Glucosamina	GlcN
Fucose	Fuc	*N*-acetilgalactosamina	GalNAc
Galactose	Gal	*N*-acetilglucosamina	GlcNAc
Glicose	Glc	Ácido murâmico	Mur
Manose	Man	Ácido *N*-acetilmurâmico	Mur2Ac
Ramnose	Rha	Ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)	Neu5Ac
Ribose	Rib		
Xilose	Xyl		

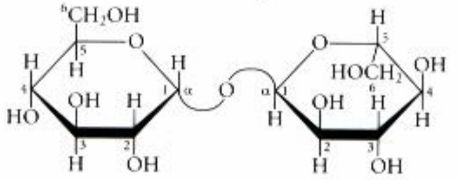
O dissacarídeo lactose (Fig. 9-12) ocorre naturalmente apenas no leite; quando hidrolisado, libera D-galactose e D-glicose. O carbono anomérico da unidade de glicose está disponível para oxidação; portanto, a lactose é um dissacarídeo redutor. O seu nome abreviado é Gal(β1→4)Glc. A sacarose (o açúcar comum) é um dissacarídeo de glicose e frutose. Ela é formada pelos vegetais, porém não pelos animais superiores. Em contraste à maltose e à lactose, a sacarose não contém átomos de carbono anoméricos livres; os átomos de carbono anoméricos de ambos os monossacarídeos estão envolvidos na ligação glicosídica (Fig. 9-12). A sacarose é portanto um açúcar não-redutor. Os dissacarídeos não-redutores são chamados **glicosídeos**; as posições ligadas são dos carbonos anoméricos. Na nomenclatura abreviada, uma seta dupla conecta os símbolos que especificam os carbonos anoméricos e suas configurações. Por exemplo, o nome abreviado da sacarose é correto tanto na forma Glc(α1↔2β)Fru, como na forma Fru(β2↔1α)Glc. A sacarose é o principal intermediário da fotossíntese; em muitos vegetais, ela é a principal forma na qual o açúcar é transportado das folhas até as demais partes da planta. A trealose Glc(α1↔1α)Glc (Fig. 9-12) é um dissacarídeo de D-glicose que, como a sacarose, é um açúcar não-redutor. Este é o principal constituinte da hemolinfa, o fluido circulante dos insetos, que serve como um composto de armazenamento de energia.



Lactose (forma β)
β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranose
Gal(β1→4)Glc



Sacarose
α-D-glicopiranosil β-D-frutofuranosídeo
Glc(α1↔2β)Fru



Trealose
α-D-glicopiranosil α-D-glicopiranosídeo
Glc(α1↔1α)Glc

Figura 9-12 – Alguns dissacarídeos comuns. Da mesma maneira que a maltose na Figura 9-11, esses dissacarídeos são mostrados nas fórmulas em perspectiva de Haworth. Os nomes comuns, os nomes sistemáticos completos e as abreviações são dados para cada um deles.

Polissacarídeos

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média até alta massa molecular. Os polissacarídeos, também chamados **glicanos**, diferem entre si na identidade das suas unidades monossacarídicas e nos tipos de ligação que os unem, no comprimento das suas cadeias e no grau de ramificação destas. Os **homopolissacarídeos** contêm apenas um único tipo de unidade monomérica; os **heteropolissacarídeos** contêm dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas (Fig. 9-13). Alguns homopolissacarídeos servem como forma de armazenamento de monossacarídeos empregados como combustíveis pelas células; o amido e o glicogênio são homopolissacarídeos desse tipo. Outros homopolissacarídeos, como a celulose e a quitina, são utilizados como elementos estruturais das paredes celulares vegetais e de exoesqueletos de animais, respectivamente. Os heteropolissacarídeos fornecem suporte extracelular nos organismos de todos os rei-

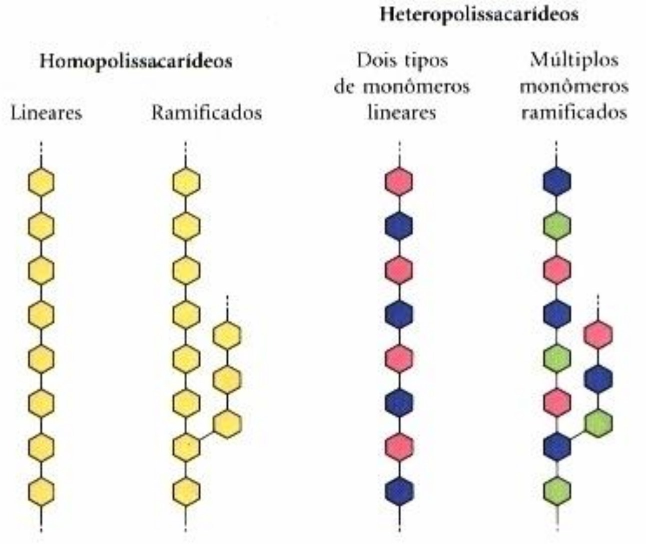

Heteropolissacarídeos
Homopolissacarídeos
Lineares
Ramificados
Dois tipos de monômeros lineares
Múltiplos monômeros ramificados

Figura 9-13 – Os polissacarídeos podem ser compostos por um, dois ou vários monossacarídeos diferentes, ligados entre si em cadeias lineares ou ramificadas de comprimento variado.

nos naturais. Por exemplo, a camada rígida do envoltório das células bacterianas (peptideoglicano) é constituída por uma parte que é um heteropolissacarídeo formado por duas unidades monossacarídicas alternantes. Nos tecidos animais, o espaço extracelular é ocupado por vários tipos de heteropolissacarídeos, que formam uma matriz que mantém as células individuais unidas, fornecendo-lhes proteção, forma e suporte, funções que se estendem aos tecidos e órgãos.

De forma diferente das proteínas, os polissacarídeos em geral não têm massas moleculares definidas. Essa diferença é uma conseqüência dos mecanismos de montagem dos dois tipos de polímeros. Como será visto no Capítulo 27, as proteínas são sintetizadas a partir de um molde (RNA mensageiro) com seqüência de bases e tamanho definidos, por meio da ação de enzimas que copiam exatamente o molde. Para a síntese de polissacarídeos não há nenhum molde; em vez disso, o programa para síntese de polissacarídeos é intrínseco às enzimas que catalisam a polimerização das unidades monoméricas.

O amido e o glicogênio são combustíveis armazenados

Os polissacarídeos de armazenamento mais importantes são o amido nas células vegetais e o glicogênio nas células animais. Esses dois polissacarídeos ocorrem intracelularmente como grandes agregados ou grânulos (Fig. 9-14). As moléculas de amido e glicogênio são altamente hidratadas, porque elas têm muitos grupos hidroxila expostos e capazes de formar pontes de hidrogênio com a água. A maioria das células vegetais tem a habilidade de sintetizar o amido, porém ele é especialmente abundante nos tubérculos, como as batatas, e nas sementes, como o grão de milho.

Amido contém dois tipos de polímeros da glicose, a amilose e a amilopectina (Fig. 9-15). O primeiro consiste de cadeias longas, não-ramificadas de unidades de D-glicose conectadas por ligações ($\alpha1\rightarrow4$). Tais cadeias variam em massa molecular de uns poucos milhares até mais de um milhão. A amilopectina também tem uma alta massa molecular (até 100 milhões), porém, ao contrário da amilose, é altamente ramificada. As ligações glicosídicas encontradas entre as unidades de glicose nas cadeias da amilopectina são ($\alpha1\rightarrow4$), mas os pontos de ramificação (cerca de 1 a cada 24 a 30 unidades) são ($\alpha1\rightarrow6$).

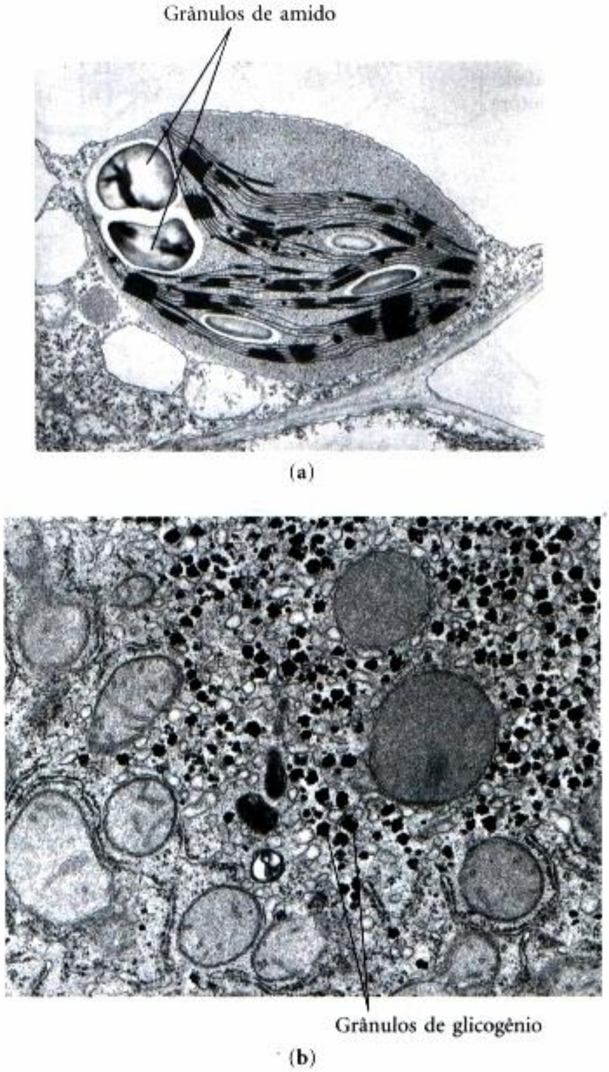


Figura 9-14 – Microfotografias eletrônicas dos grânulos de amido e do glicogênio. (**a**) Grandes grânulos de amido em um único cloroplasto. O amido é formado no cloroplasto a partir de D-glicose oriunda da fotossíntese. (**b**) Grânulos de glicogênio em um hepatócito. Estes grânulos são formados no citosol e são muito menores (~0,1 μm) do que os grânulos de amido (~1 μm).

Glicogênio é o principal polissacarídeo de armazenamento das células animais. Como a amilopectina, o glicogênio é um polímero de subunidades de glicose unidas por meio de ligações ($\alpha1\rightarrow4$), com ligações ($\alpha1\rightarrow6$) nas ramificações, mas o glicogênio é mais extensamente ramificado (em média, uma ramificação a cada 8 a 12 unidades) e mais compacto do que o amido. O glicogênio é especialmente abundante no fígado, onde ele constitui até 7% do peso úmido do órgão; ele também está presente no músculo esquelético. Nos hepatócitos, o glicogênio é encontrado em grandes grânulos (Fig. 9-14b), sendo eles mesmos agregados de grânulos menores compostos por moléculas de glicogênio unitárias altamente ramificadas e com uma massa molecular média de vários milhões. Esses grânulos de glicogênio também contêm, numa forma intimamente unida, as enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação.

Devido a cada ramificação no glicogênio terminar com uma unidade de açúcar não-redutor (uma unidade sem o carbono anomérico livre), esse polímero tem tantos terminais não-redutores quantas ramificações, porém apenas um único terminal redutor. Quando o glicogênio é usado como fonte de energia, as unidades de glicose são removidas uma a uma, a partir dos ter-

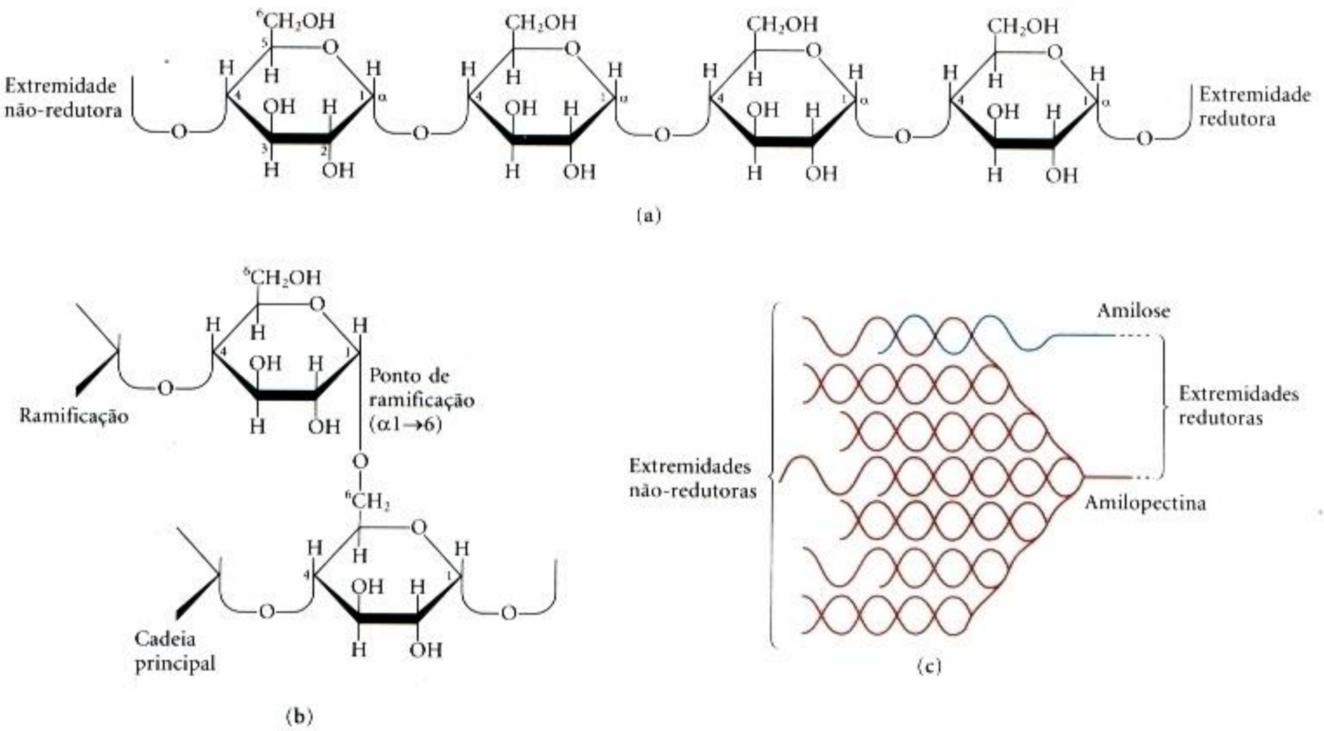


Figura 9-15 – Os dois polissacarídeos do amido, a amilose e a amilopectina. (**a**) Um pequeno segmento de amilose, um polímero linear composto por unidades de D-glicose com ligações (α1→4). Uma única cadeia do polímero pode conter vários milhares de unidades de glicose. A amilopectina tem ligações semelhantes à amilose nas unidades entre os pontos de ramificação. (**b**) No ponto de ramificação, a amilopectina, tem uma ligação (α1→6). (**c**) Um agregado de amilose e amilopectina como se acredita que ocorra nos grânulos de amido. As fibras de amilopectina (vermelho) formam estruturas em dupla hélice umas com as outras ou com as fibras de amilose (azul). As unidades de glicose, na extremidade não-redutora das ramificações externas, são retiradas enzimaticamente, uma de cada vez, durante a mobilização intracelular do amido para produção de energia. O glicogênio tem uma estrutura similar, mas é muito mais ramificado e mais compacto.

minais não-redutores. As enzimas de degradação, que agem somente nos terminais não-redutores, podem agir simultaneamente em muitos terminais, acelerando a conversão do polímero em monossacarídeo.

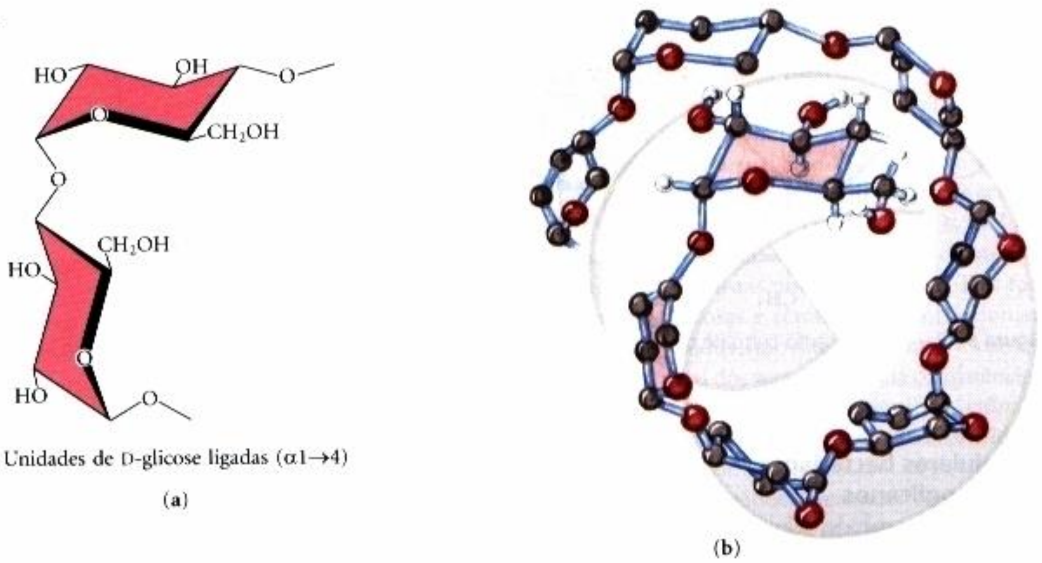
Por que não estocar a glicose na forma monomérica? Foi calculado que os hepatócitos estocam glicogênio equivalente à concentração de 0,4M de glicose. A concentração real de glicogênio, que é insolúvel e contribui pouco para a osmolaridade do citosol, é cerca de 0,01μM. Se o citosol contivesse 0,4M de glicose, a osmolaridade poderia ser perigosamente alta, levando à entrada de água por osmose, o que poderia romper a célula (veja Fig. 4-11). Além disso, com uma concentração intracelular de glicose de 0,4M e uma concentração externa aproximadamente igual a 5mM (a concentração sangüínea em um mamífero), a variação da energia livre para a captação da glicose pela célula seria contra um gradiente de concentração muito alto que poderia ser proibitivo.

A estrutura tridimensional do amido é mostrada na Figura 9-16 e pode ser comparada com a estrutura da celulose descrita a seguir.

A celulose e a quitina são homopolissacarídeos estruturais

A celulose, uma substância fibrosa, resistente e insolúvel em água, é encontrada na parede celular dos vegetais, particularmente em troncos, galhos e em todas as partes lenhosas. A celulose constitui a maior parte da massa da madeira, e o algodão é celulose quase pura. Como a amilose e as cadeias principais da amilopectina e do glicogênio, a molécula de celulose é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose. Mas há uma diferença muito importante: na celulose as unidades de glicose têm a configuração β (Fig. 9-17), enquanto na amilose, na amilopectina e no glicogênio a glicose está na configuração α. As unidades de glicose na celulose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo (β1→4). Essa diferença confere à celulose e à amilose estruturas tridimensionais e propriedades físicas muito diferentes entre si.

A estrutura tridimensional das macromoléculas dos carboidratos está baseada nos mesmos princípios fundamentais da estrutura dos polipeptídeos: as subunidades com uma estrutura mais ou menos rígida, ditada por ligações covalentes, formam as estruturas macromoleculares tridimensionais, que são estabilizadas por interações fracas. Como os polissacarídeos têm muitos grupos hidroxila, a formação de pontes de hidrogênio tem uma influência especialmente importante em suas estruturas. Os polímeros de β-D-glicose, como a celulose, podem ser representados por uma série de anéis piranosídicos rígidos conectados por um átomo de oxigênio que faz ponte entre dois átomos de carbono (ligação glicosídica). Existe rotação livre para a ligação C—O que liga as duas unidades (Fig. 9-17a). A conformação mais estável para o polímero é aquela na qual cada "cadeira" é rodada 180° em relação às subunidades vizinhas, formando uma cadeia reta e estendida. Com várias cadeias estendidas lado a lado, uma rede estabilizadora de pontes de hidrogênio inter e intracadeias produz fibras supramoleculares retas, estáveis e de grande resistência à tensão (Fig. 9-17b). A resistência à tensão da celulose tem feito dela uma substância muito útil para as civilizações através dos milênios. Muitos produtos manufaturados, incluindo o papel, papelão, raiom, placas de isolamento e outros materiais de empacotamento e construção, são derivados da celulose. A quantidade de água contida nesses materiais é baixa, porque as ligações de ponte de hidrogênio intercadeias de celulose saturam sua capacidade de formação desse tipo de ligação.

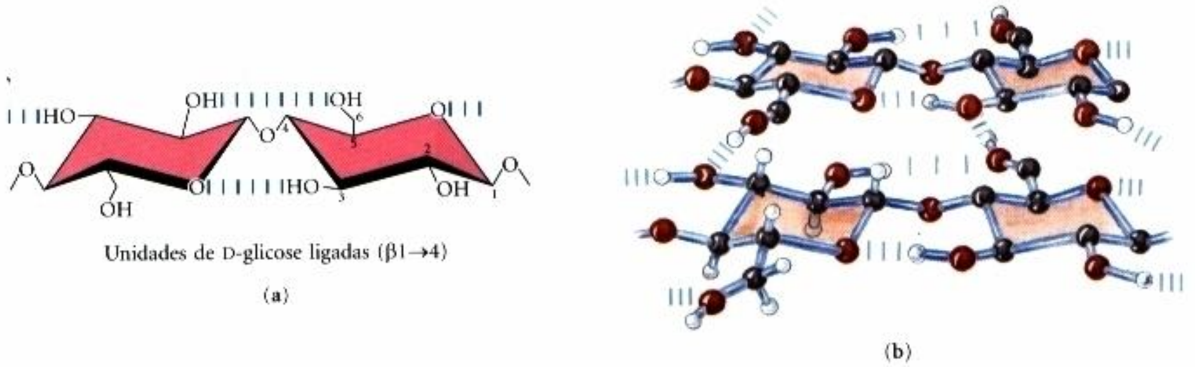


Unidades de D-glicose ligadas (α1→4)

(a)

(b)

Figura 9-16 – A estrutura do amido (amilose). (**a**) Em sua conformação mais estável, de "cadeiras" rigidas adjacentes, este polissacarídeo apresenta a cadeia curva de forma diferente da linear da celulose (veja Fig. 9-17). (**b**) Desenho em escala de um segmento da amilose. A conformação das ligações (α1→4) da amilose, da amilopectina e do glicogênio forçam estes polímeros a assumirem uma estrutura helicoidal estreitamente compacta. Estas estruturas compactas produzem os grânulos densos de estocagem de amido ou glicogênio vistos na maioria das células (veja Fig. 9-14).



Unidades de D-glicose ligadas (β1→4)

(a)

(b)

Figura 9-17 – A estrutura da celulose. (**a**) Duas unidades monossacarídicas de uma cadeia de celulose; as unidades de D-glicose têm ligação (β1→4). As estruturas rígidas em "cadeira" podem girar, uma em relação à outra. (**b**) Desenho em escala de segmentos de duas cadeias paralelas de celulose , mostrando a conformação das unidades de D-glicose e as interligações proporcionadas pelas pontes de hidrogênio. Na unidade de hexose à esquerda, embaixo, estão mostrados todos os átomos de hidrogênio; nas outras três unidades de hexoses, todos os átomos de hidrogênio ligados a carbono foram omitidos, em benefício da clareza, já que eles não participam da formação das pontes de hidrogênio.

Diferentemente das fibras lineares produzidas pelas ligações (β1→4) em polímeros, como a celulose, a conformação mais favorável para ligação (α1→4) dos polímeros de D-glicose, como o amido e o glicogênio, é uma estrutura helicoidal compacta e estabilizada por pontes de hidrogênio (Fig. 9-16).

O glicogênio e o amido, ingeridos na dieta, são hidrolisados por α-amilases, enzimas da saliva e das secreções intestinais que rompem as ligações glicosídicas (α1→4) entre as unidades de glicose. A celulose não pode ser usada pela maioria dos animais como uma fonte de energia, porque falta-lhes uma enzima que hidrolise as ligações (β1→4). Os térmitas, ou cupins, digerem facilmente a celulose (e, portanto, a madeira), mas isso só ocorre porque o seu trato intestinal abriga um microrganismo simbiótico, *Trichonympha*, que secreta uma enzima chamada celulase, a qual hidrolisa as ligações (β1→4) entre as unidades de glicose. Os fungos e as bactérias da madeira em decomposição também produzem celulase. Os únicos vertebrados que conseguem utilizar a celulose como alimento são os bovinos e outros animais ruminantes (ovelhas, cabras, camelos, girafas). O estômago extra desses animais (rúmen) contém protistas e bactérias que secretam celulase.

A quitina é um homopolissacarídeo linear composto por unidade de *N*-acetil-D-glucosamina em ligação β (Fig. 9-18). Sua única diferença química com a celulose é a substituição de um grupo hidroxila em C-2 por um grupo amino acetilado. A quitina forma fibras estendidas similares àquelas da celulose e, como a celulose, não é digerível por animais vertebrados. A quitina é o principal componente do exoesqueleto duro de aproximadamente 1 milhão de espécies de artrópodos, por exemplo, insetos, lagostas e caranguejos. Provavelmente, depois da celulose, é o polissacarídeo mais abundante na natureza.

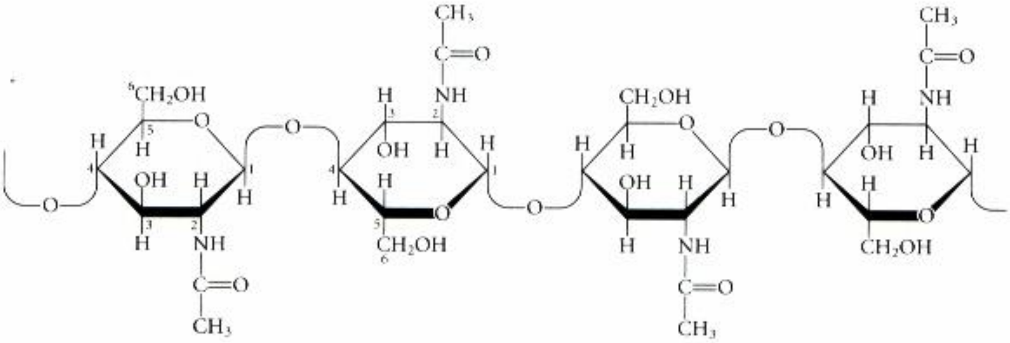


Figura 9-18 – Um segmento curto de quitina, um homopolímero de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina em ligação (β1→4).

As paredes celulares bacterianas contêm peptideoglicanos

O componente rígido das paredes celulares bacterianas é um heteropolímero constituído por unidades alternantes, unidas por ligação (β1→4), de *N*-acetilglucosamina e ácido *N*-acetilmurâmico (Fig. 9-19). Os polímeros lineares justapõem-se na parede celular e são interligados por peptídeos pequenos, as suas estruturas exatas dependem das espécies bacterianas consideradas. As ligações cruzadas do peptídeo unem as cadeias polissacarídicas a um revestimento forte que envolve inteiramente a célula e a protege de lise devido à entrada de água por osmose. A enzima lisozima, que hidrolisa as ligações glicosídicas (β1→4) entre a *N*-acetilglucosamina e o ácido *N*-acetilmurâmico, mata as células bacterianas. A lisozima está presente nas lágrimas, presumivelmente como uma defesa contra as infecções bacterianas nos olhos. Ela também é produzida por certos vírus bacterianos para assegurar a sua liberação da célula da bactéria hospedeira, um passo essencial no ciclo da infecção viral. A penicilina e os antibióticos relacionados matam as bactérias, impedindo a síntese das ligações cruzadas, o que torna a parede celular muito fraca para resistir à lise por osmose (veja Adendo 20-1).

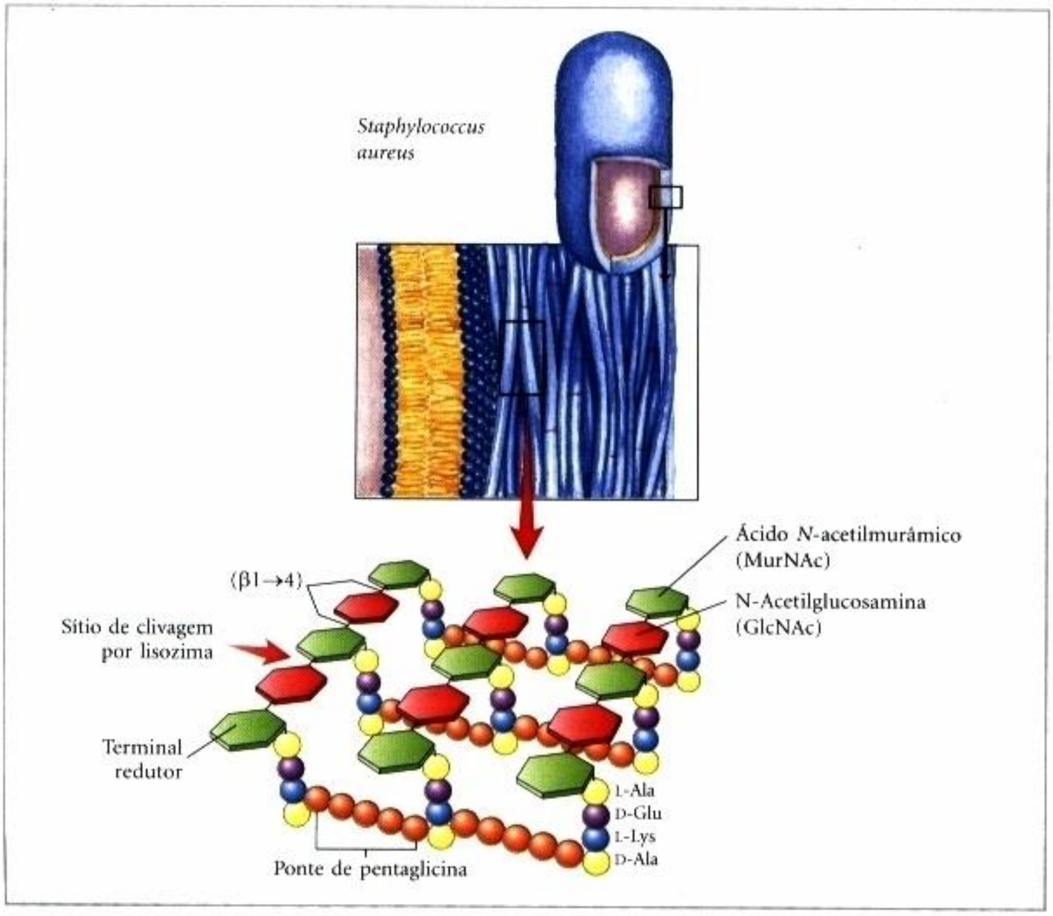

Staphylococcus aureus
Ácido *N*-acetilmurâmico (MurNAc)
N-Acetilglucosamina (GlcNAc)
(β1→4)
Sítio de clivagem por lisozima
Terminal redutor
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala
Ponte de pentaglicina

Figura 9-19 – O peptideoglicano. Esta é a representação do peptideoglicano da parede celular da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Os peptídeos (mostrados nas fileiras de esferas coloridas) estão ligados covalentemente às unidades de ácido *N*-acetilmurâmico nas cadeias polissacarídicas vizinhas. Note a mistura de D e L-aminoácidos nestes peptídeos. Bactérias gram-positivas como *S. aureus* têm uma cadeia de pentaglicina interligando os peptídeos. Bactérias gram-negativas como *E. coli* não apresentam a pentaglicina; em vez disso, o resíduo terminal de D-Ala de um tetrapeptídeo está diretamente ligado ao tetrapeptídeo vizinho por meio da L-Lys ou de um aminoácido semelhante à lisina, o ácido diaminopimélico.

Os glicosaminoglicanos são componentes da matriz extracelular

O espaço extracelular nos tecidos de animais multicelulares é preenchido com um material geleificado, chamado de **matriz extracelular** ou, ainda, conhecido como substância fundamental, que mantém unidas as células de um tecido e fornece uma via porosa para a difusão dos nutrientes e do oxigênio para as células individuais. A matriz extracelular é composta por uma rede de heteropolissacarídeos e por proteínas fibrosas interconectadas, tais como colágeno, elastina, fibronectina e laminina. Os heteropolissacarídeos, chamados **glicosaminoglicanos**, são uma família de polímeros lineares compostos por unidades repetitivas de dissacarídeos (Fig. 9-20). Um dos monossacarídeos que compõem os dissacarídeos é sempre a *N*-acetilglucosamina ou a *N*-acetilgalactosamina, o outro na maioria dos casos é um ácido urônico, usualmente o ácido D-glucurônico ou o ácido L-idurônico. Em alguns glicosaminoglicanos, uma ou mais das hidroxilas do açúcar aminado estão esterificadas com sulfato. A combinação desses grupos sulfato e dos grupos carboxilato das unidades de ácido urônico dá aos glicosaminoglicanos uma alta densidade de cargas negativas. Para minimizar as forças repulsivas entre os grupos carregados vizinhos, essas moléculas assumem uma conformação estendida quando em solução. O padrão característico das unidades sulfatadas e não-sulfatadas nos glicosaminoglicanos estabelece um reconhecimento específico por uma variedade de proteínas ligantes que se associam eletrostaticamente com essas moléculas. Os glicosaminoglicanos estão ligados a proteínas extracelulares para formar os **proteoglicanos** (discutidos a seguir).

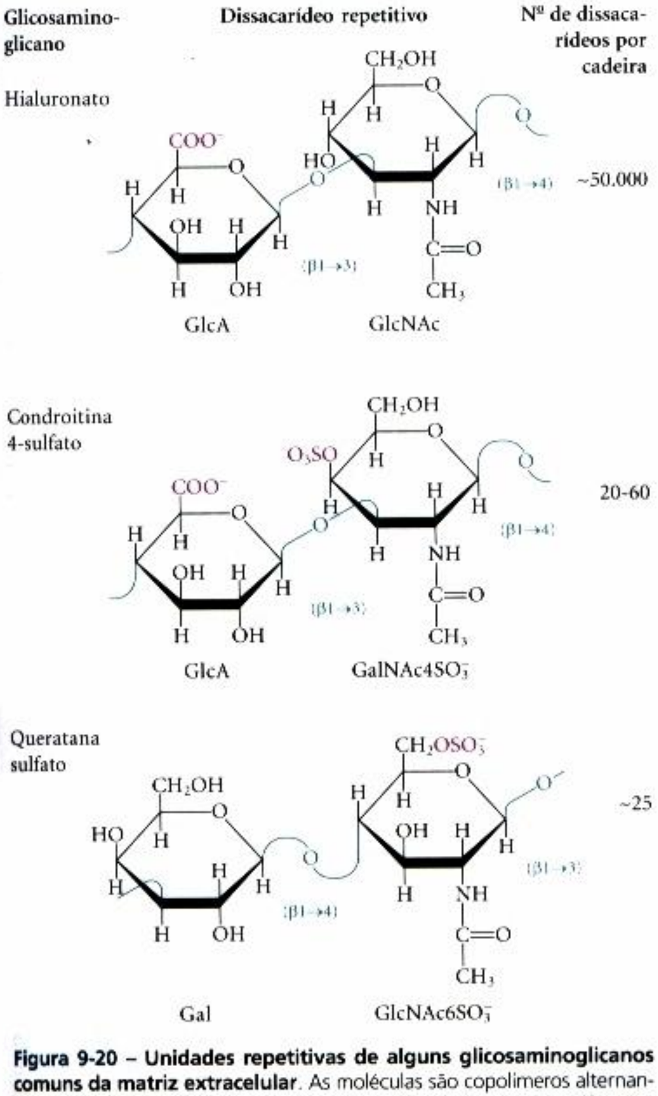


Figura 9-20 – Unidades repetitivas de alguns glicosaminoglicanos comuns da matriz extracelular. As moléculas são copolímeros alternando unidades de ácido urônico e de aminoaçúcar com ésteres de sulfato em algumas das posições. Os grupos ionizados, carboxilato e sulfato (vermelho), dão a esses polímeros sua característica de carga altamente negativa.

O glicosaminoglicano **ácido hialurônico** (hialuronato em pH fisiológico) contém unidades alternadas de ácido D-glucurônico e *N*-acetilglucosamina (Fig. 9-20). Os hialuronatos têm massas moleculares acima de 1 milhão; tendo até 50.000 unidades repetitivas compostas por dissacarídeos. Eles formam soluções altamente viscosas e claras, as quais funcionam como lubrificantes nos fluidos sinoviais das juntas e conferem ao humor vítreo dos olhos dos vertebrados sua consistência semelhante à da gelatina (do grego *hyalos* que significa "vidro"; hialuronatos podem ter uma aparência vítrea ou translúcida). O hialuronato é também um componente essencial da matriz extracelular das cartilagens e dos tendões, nos quais contribui para sua elasticidade característica e para a resistência à tensão, como resultado das fortes interações que apresenta com os outros componentes da matriz. A hialuronidase, uma enzima secretada por algumas bactérias patogênicas (causadoras de doenças), pode hidrolisar as ligações glicosídicas do hialuronato, tornando os tecidos mais suscetíveis à invasão pelas bactérias. Em muitos organismos, uma enzima semelhante, no esperma, hidrolisa uma capa externa de glicosaminoglicano que envolve o óvulo, permitindo a penetração do espermatozóide.

Outros glicosaminoglicanos diferem do hialuronato em dois aspectos: eles são geralmente polímeros muito curtos e covalentemente ligados a proteínas específicas (proteoglicanos, discutidos a seguir). A condroitina sulfato (do grego *chondros* que significa "cartilagem") contribui para a resistência à tensão na cartilagem, tendões, ligamentos e paredes da aorta. A dermatana sulfato (do grego *derma*, "pele") colabora com a flexibilidade da pele e também está presente nos vasos sangüíneos e válvulas do coração. A queratina sulfato (do grego *keras*, "cornos") não possui ácido urônico e a quantidade de sulfato é variável. Esse polímero está presente na córnea, cartilagens, ossos e em uma variedade de estruturas calosas formadas por células mortas: chifres, cabelos, cascos, unhas e garras. A heparina (do grego *hēpar*, "fígado") é um anticoagulante natural, sintetizado nos mastócitos e liberado no sangue, no qual inibe a coagulação pela ligação e estimulação simultânea da proteína anticoagulante, antitrombina III. A interação entre a heparina e a antitrombina III é fortemente eletrostática; a heparina é a macromolécula biológica mais bem conhecida, que contém a mais alta densidade de carga negativa. A heparina purificada é rotineiramente adicionada a amostras de sangue colhidas para análises clínicas e sangue doado para transfusão, a fim de evitar a coagulação.

A Tabela 9-2 resume a composição, as propriedades, a ocorrência e a função dos polissacarídeos descritos neste tópico.

Glicoconjugados: Proteoglicanos, Glicoproteínas e Glicolipídios

Além das suas importantes funções como armazenamento energético (amido, glicogênio) e materiais estruturais (celulose, quitina, peptideoglicano), os polissacarídeos (e oligossacarídeos) são portadores de informações, eles servem como indicadores de endereçamento para algumas proteínas e como mediadores para interações específicas célula-célula e célula-matriz extracelular. As moléculas que contêm carboidratos específicos agem no reconhecimento e na adesão célula-célula, na migração celular durante

Tabela 9-2 – Estrutura e função de alguns polissacarídeos

Polímero	Tipo*	Unidade repetitiva†	Tamanho (número de unidades monossacarídicas)	Funções
Amido				Armazenagem de energia: nos vegetais
Amilose	Homo	(α1→4)Glc, linear	50-5.000	
Amilopectina	Homo	(α1→4)Glc,com ramos (α1→6)Glc a cada 24-30 unidades	Até 10^6	
Glicogênio	Homo	(α1→4)Glc, com ramos (α1→6)Glc a cada 8-12 unidades	até 50.000	Armazenagem de energia: nas bactérias e células animais
Celulose	Homo	(β1→4)Glc	Até 15.000	Estrutural: nos vegetais, fornece rigidez e resistência às paredes celulares
Quitina	Homo	(β1→4)GlcNAc	Muito grande	Estrutural: em insetos, aranhas e crustáceos, fornece rigidez e resistência ao exoesqueleto
Peptideoglicano	Hetero; ligado com peptídeo	4)Mur2Ac(β1→4) GlcNAc(β1	Muito grande	Estrutural: em bactérias, fornece rigidez e resistência ao envoltório celular
Hialuronato (glicosaminoglicano)	Hetero; ácido	4)GlcA(β1→3) GlcNAc(β1	até 100.000	Estrutural: em vertebrados, matriz extracelular da pele e tecido conjuntivo; viscosidade e lubrificação nas articulações

* Cada polímero é classificado como homopolissacarídeo (homo) ou como heteropolissacarídeo (hetero).

† Os nomes abreviados para os peptideoglicanos e hialuronato indicam que o polímero contém unidades repetitivas de dissacarídeos, com o GlcNAc de uma unidade dissacarídica ligada β(1→ 4) à primeira unidade da próxima unidade dissacarídica.

desenvolvimento, no revestimento sangüíneo, na resposta imune e na cicatrização de lesões, apenas para citar algumas de suas funções. Na maioria dos casos, o carboidrato sinalizador é covalentemente ligado à proteína ou ao lipídio para formar um **glicoconjugado**, que é a molécula biologicamente ativa.

Proteoglicanos são macromoléculas da superfície da célula ou da matriz extracelular, nos quais uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos estão ligadas covalentemente a uma proteína de membrana ou a uma proteína secretada. A parte formada pelo glicosaminoglicano comumente é a maior fração (em massa) da molécula de proteoglicano, predominando na estrutura, e é freqüentemente o principal sítio da atividade biológica. Em muitos casos, a atividade biológica é resultante de múltiplos sítios de ligação, ricos em possibilidades de realizar pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas com outras proteínas da superfície celular ou da matriz extracelular. Os proteoglicanos são o maior componente dos tecidos conectivos, tais como cartilagens, nos quais suas muitas interações não-covalentes com outros proteoglicanos, proteínas e glicosaminoglicanos produzem rigidez e elasticidade.

Glicoproteínas têm um ou vários oligossacarídeos de complexidade variada ligados covalentemente à proteína. Elas são encontradas no lado externo da membrana plasmática, na matriz extracelular e no sangue. No interior das células, elas são encontradas em organelas específicas, tais como o complexo de Golgi, os grânulos secretores e os lisossomos. As frações oligossacarídicas das glicoproteínas são menos repetitivas do que as cadeias de glicosaminoglicanos dos proteoglicanos, elas são ricas em informações, compondo sítios altamente específicos para o reconhecimento e a ligação de alta afinidade com outras proteínas.

Glicolipídios são lipídios de membrana nos quais os grupos hidrofílicos da "cabeça" são oligossacarídeos, que, como nas glicoproteínas, agem como sítios específicos para o reconhecimento pelas proteínas ligadas a carboidratos.

A glicobiologia, o estudo da estrutura e função de glicoconjugados, é uma das mais ativas e excitantes áreas da bioquímica e da biologia celular. Nossas discussões utilizam apenas alguns poucos exemplos para ilustrar a diversidade estrutural e de atividades biológicas dos glicoconjugados. No Capítulo 20, discutiremos a biossíntese dos polissacarídeos, incluindo os glicosaminoglicanos e, no Capítulo 27, a síntese das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas.

Os proteoglicanos são macromoléculas da superfície celular e da matriz extracelular, contendo glicosaminoglicanos

As unidades básicas dos proteoglicanos consistem em uma "proteína central" ligada covalentemente a glicosaminoglicano(s). Por exemplo, a estrutura laminar da matriz extracelular (lâmina basal), que separa grupos organizados de células, contém uma família de proteínas centrais (M_r de 20.000 a 40.000), cada uma com várias cadeias de heparana sulfato ligadas covalentemente. A heparana sulfato é estruturalmente similar à heparina, porém apresenta menor grau de esterificação por grupos sulfato. O ponto de ligação é comumente um resíduo de Ser, no qual o glicosaminoglicano é ligado por meio de pontes feitas por um trissacarídeo (Fig. 9-21). O resíduo de Ser é geralmente da seqüência –Ser–Gly–X–Gly– (onde X é qualquer resíduo de aminoácido), embora, nem todas as proteínas com essa seqüência tenham glicosaminoglicano ligado. Muitos proteoglicanos são secretados na matriz extracelular, mas alguns são proteínas integrais de membrana. Por exemplo, a proteína central sindecana (M_r 56.000) tem um domínio transmembrana único e um domínio extracelular de reconhecimento formado por três cadeias de heparana sulfato e duas de condroitina sulfato ligadas, cada

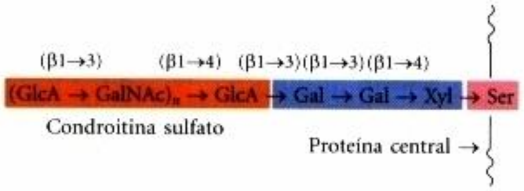


Figura 9-21 – A estrutura de um proteoglicano mostrando a ponte de trissacarídeo. Um trissacarídeo ligante típico (azul) conecta um glicosaminoglicano — no caso a condroitina sulfato (laranja) — por meio de um resíduo de Ser (vermelho) da proteína central. A unidade de xilose do terminal redutor do ligante é unida pelo seu carbono anomérico ao grupo hidroxila do resíduo de Ser.

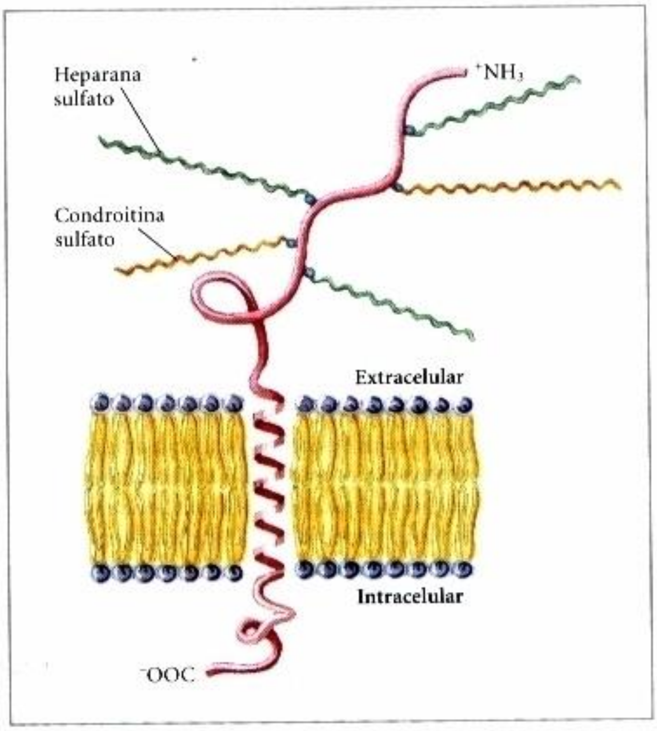


Figura 9-22 – Estrutura de um proteoglicano de uma proteína integral de membrana. O diagrama esquemático mostra a sindecana, uma proteína central da membrana plasmática. O domínio aminoterminal no lado extracelular da membrana é covalentemente ligado (pelo trissacarídeo ligante como mostrado na Fig. 9-21) a três cadeias de heparana sulfato e a duas de condroitina sulfato.

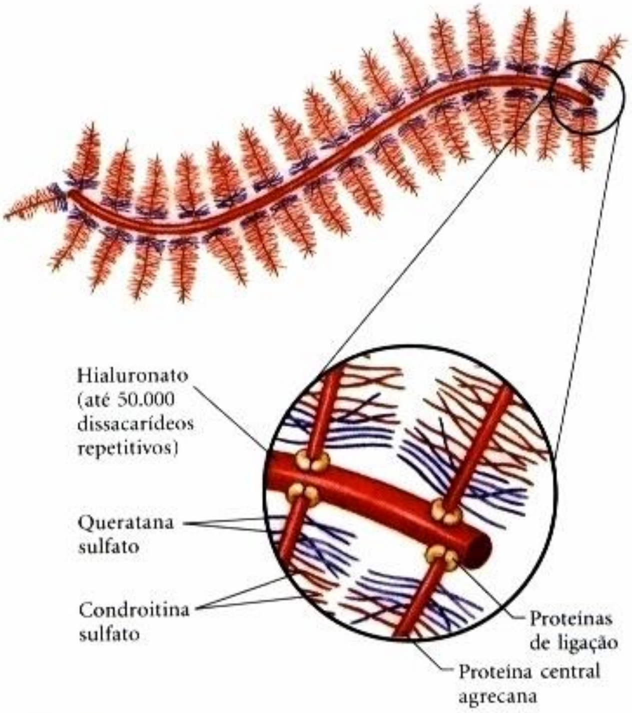

Hialuronato (até 50.000 dissacarídeos repetitivos)
Queratana sulfato
Condroitina sulfato
Proteínas de ligação
Proteína central agrecana

Figura 9-23 – Um agregado de proteoglicano da matriz extracelular. Uma molécula muito longa de hialuronato é associada não-covalentemente a cerca de 100 moléculas de uma proteína central agrecana. Cada molécula de agrecana contém muitas cadeias de condroitina sulfato e queratana sulfato ligadas covalentemente. Proteínas ligadas, situadas nas junções entre cada proteína central e a cadeia principal de hialuronato, medeiam a interação proteína central–hialuronato.

uma delas, a um resíduo de Ser (Fig. 9-22). Uma parte das moléculas de heparana sulfato liga-se a uma variedade de ligantes extracelulares e assim modula a interação de ligantes com receptores específicos da superfície da célula.

Alguns proteoglicanos podem formar **agregados de proteoglicanos**, enormes agregados supramoleculares de muitas proteínas centrais, todas ligadas a uma molécula simples de hialuronato. A proteína central agrecana (M_r ~250.000) tem cadeias múltiplas de condroitina sulfato e queratana sulfato, cada uma delas ligadas aos resíduos de Ser da proteína central por meio de trissacarídeos ligantes, resultando em um monômero de agrecana de M_r ~2×10^6. Quando uma centena ou mais dessas moléculas de proteínas centrais ("decoradas") ligam-se a uma única molécula estendida de hialuronato (Fig. 9-23), o agregado de proteoglicano resultante ($M_r > 2 \times 10^8$) e a sua água de hidratação ocupam um volume aproximadamente igual ao de uma célula de bactéria! Uma agrecana interage fortemente com o colágeno na matriz extracelular da cartilagem, contribuindo para o seu desenvolvimento e resistência à tensão.

Entrecruzadas com esses enormes proteoglicanos extracelulares estão proteínas fibrosas da matriz, tais como o colágeno, a elastina e a fibronectina, formando uma rede de interligações que proporcionam resistência e resiliência. Algumas dessas proteínas são multiadesivas, uma proteína simples tendo sítios de ligação para várias moléculas diferentes da matriz. A fibronectina, por exemplo, tem domínios separados que ligam fibrina, heparana sulfato, colágeno e uma família de proteínas da membrana plasmática chamadas integrinas que medeiam a sinalização entre o interior da célula e a matriz extracelular (veja Fig. 12-19). Em torno das integrinas existem sítios de ligação para inúmeras outras moléculas extracelulares. A figura das interações célula-matriz (Fig. 9-24) mostra uma ordem de interação entre moléculas celulares e ex-

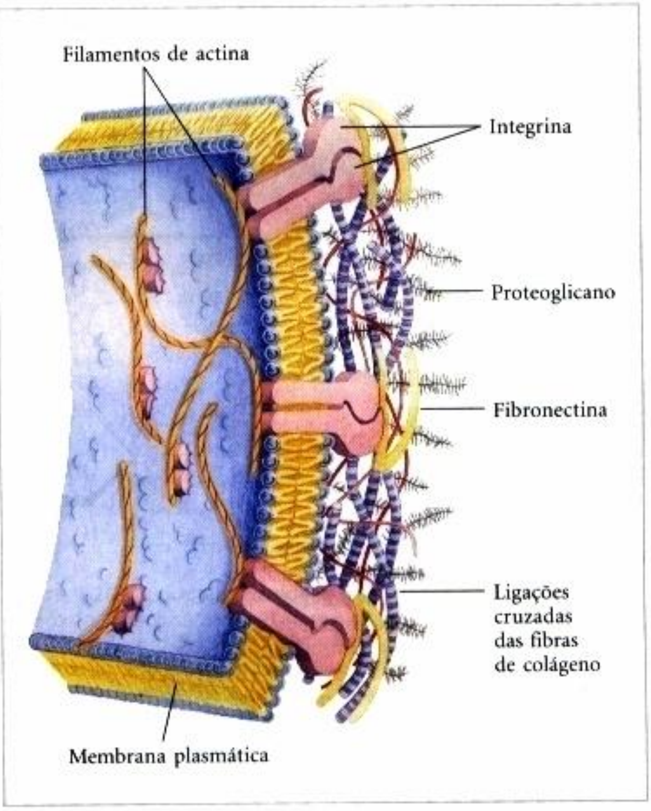


Figura 9-24 – Interações entre as células e a matriz extracelular. A associação entre as células e os proteoglicanos da matriz extracelular é mediada por uma proteína de membrana (integrina) e por uma proteína extracelular (neste exemplo, a fibronectina), com sítios de ligação tanto para a integrina como para o proteoglicano. Note a íntima associação das fibras de colágeno com a fibronectina e o proteoglicano.

tracelulares. Essas interações não servem meramente para ancorar as células à matriz extracelular, mas também para produzir vias que dirigem a migração das células nos tecidos em desenvolvimento e, por meio das integrinas, transportam informações em ambas as direções por meio da membrana plasmática.

Os proteoglicanos da matriz são essenciais na resposta das células a certos fatores de crescimento extracelulares. Por exemplo, o fator de crescimento do fibroblasto (FGF), uma proteína sinalizadora extracelular que estimula a divisão celular, primeiro se liga a uma porção da heparana sulfato das moléculas de sindecana na membrana plasmática da célula-alvo. A sindecana, então, "apresenta" o FGF ao receptor específico para FGF na membrana plasmática, e somente assim o FGF pode interagir produtivamente com esses receptores para iniciar a divisão celular.

As glicoproteínas são conjugados ricos em informações contendo oligossacarídeos

As glicoproteínas são conjugados de carboidrato-proteína nos quais a parte dos carboidratos são menores e estruturalmente mais variados do que os glicosaminoglicanos nos proteoglicanos. Os carboidratos estão ligados com o grupo hidroxila do resíduo de Ser ou Thr (*O*-ligados) por meio do carbono anomérico por ligação glicosídica, ou por meio de ligação *N*-glicosídica com o nitrogênio da função amida de um resíduo de Asn (*N*-ligado) (Fig. 9-25). Algumas glicoproteínas têm uma cadeia oligossacarídica simples, mas muitas têm mais do que uma; o carboidrato pode constituir de 1% a 70% ou ainda mais da massa da glicoproteína. As estruturas de um grande número de oligossacarídeos *O* e *N*-ligados de uma variedade de glicoproteínas são conhecidas; a Figura 9-25 mostra alguns exemplos típicos.

Como veremos no Capítulo 12, a superfície externa da membrana plasmática tem muitas glicoproteínas unidas covalentemente a oligossacarídeos de complexidade variada. Uma das glicoproteínas de membrana mais bem caracterizadas é a glicoforina A da membrana de eritrócito (veja Fig. 12-10). Ela contém 60% da massa em carboidrato, formado por 16 cadeias oligossacarídicas (totalizando 60 a 70 unidades monossacarídicas) covalentemente ligadas a resíduos de aminoácidos próximos ao aminoterminal da cadeia polipeptídica. Quinze das cadeias oligossacarídicas são *O*-ligadas a resíduos de Ser ou Thr, e uma é *N*-ligada a um resíduo de Asn.

Muitas das proteínas secretadas pelas células eucarióticas são glicoproteínas, incluindo a maioria das proteínas do sangue. Por exemplo, imunoglobulinas (anticorpos) e certos hormônios, tais como hormônio estimulante do folículo, hormônio luteinizante e hormônio estimulante da tireóide. Muitas proteínas do leite, incluindo a lactoalbumina e algumas proteínas secretadas pelo pâncreas (por exemplo a ribonuclease), são glicosiladas, bem como a maioria das proteínas contidas em lisossomos.

As vantagens biológicas da adição de oligossacarídeos às proteínas não estão completamente entendidas. Os agregados altamente hidrofílicos de carboidratos alteram a polaridade e a solubilidade das proteínas com as quais estão conjugados. As cadeias de oligossacarídeos ligadas a proteínas recém-sintetizadas no complexo de Golgi podem também influenciar a seqüência dos eventos que se processam durante o enovelamento do polipeptídeo que determina a estrutura terciária da proteína (veja Fig. 27-36). As interações estéricas entre peptídeo e oligossacarídeo podem impedir uma rota de enovelamento e favorecer outra. Quando numerosas cadeias de oligossacarídeos carregados negativamente são agregadas em uma única região de uma proteína, a repulsão entre as cargas favorece então, nessa região, a formação de uma estrutura estendida, semelhante a um bastão. A densidade e a carga negativa das cadeias de oligossacarídeos também protegem algumas proteínas do ataque de enzimas proteolíticas.

Além desses efeitos físicos globais sobre a estrutura protéica, existem efeitos biológicos mais específicos das cadeias de oligossacarídeos nas glicoproteínas. Já havíamos notado anteriormente as diferenças entre as seqüências lineares ricas em informações dos ácidos nucléicos e das proteínas e a regularidade monótona dos homopolissacarídeos como a celulose (veja Fig. 3-23). Os oligossacarídeos ligados às glicoproteínas em geral não são monótonos, porém são muito ricos em informação estrutu-

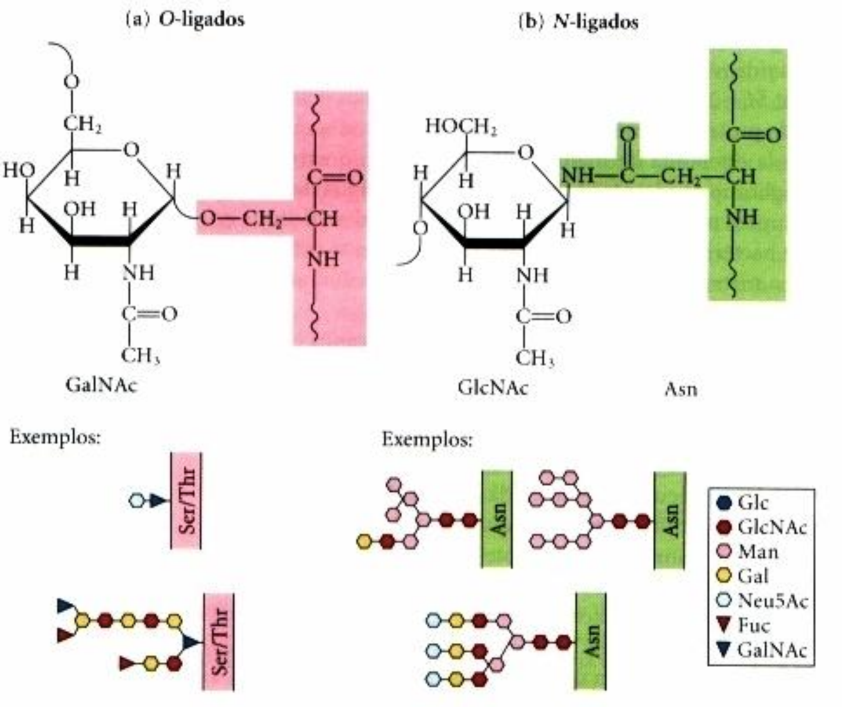


Figura 9-25 – Oligossacarídeos ligados em glicoproteínas. (**a**) Os oligossacarídeos *O*-ligados têm uma ligação glicosídica do grupo hidroxila dos resíduos de Ser ou Thr (sombreado em rosa), representada aqui por GalNAc como açúcar no terminal redutor do oligossacarídeo. Uma cadeia simples e uma cadeia complexa são mostradas. (Relembre que Neu5Ac — ácido *N*-acetilneuramínico — é comumente chamado ácido siálico). (**b**) Os oligossacarídeos *N*-ligados têm uma ligação *N*-glicosil ao nitrogênio da amida no resíduo de Asn (sombreado em verde), representado aqui por GlcNAc como açúcar terminal. Três tipos comuns de cadeias oligossacarídicas que são *N*-ligadas nas glicoproteínas são mostradas. Uma descrição completa da estrutura do oligossacarídeo requer especificação da posição e estereoquímica (α ou β) de cada ligação glicosídica.

ral. Considere as cadeias de oligossacarídeos na Figura 9-25, elas são típicas daquelas encontradas em muitas glicoproteínas. As mais complexas delas mostram conter 14 unidades de monossacarídeos, de quatro tipos diferentes, variadamente unidos entre si com ligações (1→2), (1→3), (1→4), (1→6), (2→3) e (2→6), alguns com a configuração α e outros com a configuração β. O número de permutações e combinações possíveis dos tipos de monossacarídeos e de ligações glicosídicas em um oligossacarídeo desse tamanho é astronomicamente grande. Cada um dos oligossacarídeos na Figura 9-25 apresenta, portanto, uma face única, reconhecível por enzimas e por receptores que interagem com ele. Inúmeros casos são conhecidos nos quais a mesma proteína produzida em dois tecidos tem diferentes padrões de glicosilação. A proteína humana interferon IFN-β1, produzido nas células do ovário, por exemplo, tem cadeias oligossacarídicas que diferem da mesma proteína produzida em células epiteliais mamárias. O significado biológico dessas **glicoformas teciduais** não é conhecido, mas de alguma maneira as cadeias oligossacarídicas representam um marcador específico de tecido.

Glicolipídios e lipopolissacarídeos são componentes de membrana

As glicoproteínas não são os únicos componentes celulares que possuem cadeias de oligossacarídeos complexos; alguns lipídios também contêm cadeias de oligossacarídeos ligadas covalentemente. Os **gangliosídeos** são lipídios de membrana das células de eucarioto, nos quais, o grupo da cabeça polar, a parte do lipídio que forma a superfície externa da membrana, é um oligossacarídeo complexo contendo ácido siálico (Fig. 9-9) e outras unidades de monossacarídeos. Alguns dos oligossacarídeos que fazem parte dos gangliosídeos, tais como aqueles que determinam os grupos sangüíneos humanos (veja Fig. 11-12), são idênticos àqueles encontrados em certas glicoproteínas que, conseqüentemente, também contribuem para a determinação dos tipos de grupos sangüíneos. Como os oligossacarídeos que fazem parte das glicoproteínas, esses lipídios de membrana são geralmente, talvez sempre, encontrados na face externa da membrana plasmática.

Lipopolissacarídeos são os componentes principais da membrana externa de bactérias gram-negativas como a *E. coli* e a *Salmonella typhimurium*. Eles são os alvos primários dos anticorpos produzidos pelo sistema imunológico de vertebrados em resposta à infecção bacteriana e são, conseqüentemente, importantes determinantes do sorotipo de linhagens de bactérias (sorotipos são linhagens distintas com base nas suas propriedades antigênicas). Os lipopolissacarídeos da *S. typhimurium* contêm seis ácidos graxos ligados a duas unidades de glucosamina, um dos quais é um ponto de ligação para um oligossacarídeo complexo (Fig. 9-26). A *E. coli* é semelhante, mas apresenta apenas um lipopolissacarídeo. Os lipopolissacarídeos de algumas bactérias são tóxicos para o homem e outros animais; por exemplo, eles são responsáveis pela perigosa hipotensão sangüínea que ocorre na síndrome do choque tóxico, resultante de infecções provocadas por bactérias gram-negativas.

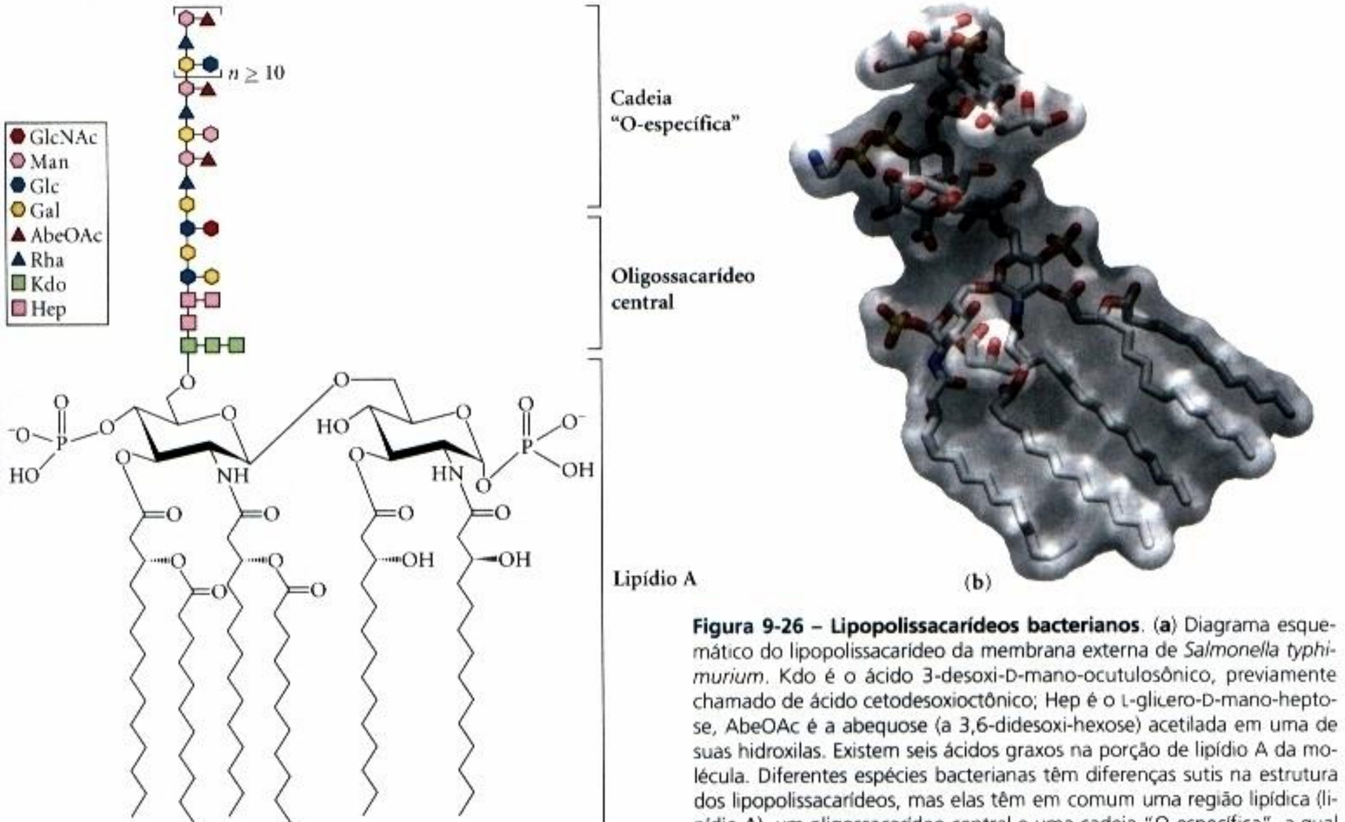


Figura 9-26 – Lipopolissacarídeos bacterianos. (**a**) Diagrama esquemático do lipopolissacarídeo da membrana externa de *Salmonella typhimurium*. Kdo é o ácido 3-desoxi-D-mano-ocutulosônico, previamente chamado de ácido cetodesoxioctônico; Hep é o L-glicero-D-mano-heptose, AbeOAc é a abequose (a 3,6-didesoxi-hexose) acetilada em uma de suas hidroxilas. Existem seis ácidos graxos na porção de lipídio A da molécula. Diferentes espécies bacterianas têm diferenças sutis na estrutura dos lipopolissacarídeos, mas elas têm em comum uma região lipídica (lipídio A), um oligossacarídeo central e uma cadeia "O-específica", a qual é o principal determinante do sorotipo (imunorreativo) da bactéria. Fora da membrana da bactéria gram-negativa *S. typhimurium* e *E. coli* estão contidas muitas moléculas lipopolissacarídicas, sendo a superfície das células virtualmente coberta de cadeias O-específicas. (**b**) Modelo molecular espaço-cheio do lipopolissacarídeo de *E. coli*. A posição da sexta cadeia de ácidos graxos não foi definida no estudo cristalográfico, por isso não está mostrada.

As interações oligossacarídeo-lectina medeiam muitos processos biológicos

Lectinas, encontradas em todos os organismos, são proteínas que ligam carboidratos com alta afinidade e especificidade. Um número de pontes de hidrogênio, situadas estrategicamente no domínio de reconhecimento para carboidrato em cada tipo de proteína, liga oligossacarídeos específicos, sendo assim, as lectinas facilmente distinguem açúcares muito semelhantes (Tabela 9-3). As lectinas servem em uma ampla variedade de processos de reconhecimento célula-célula e processos de adesão. Aqui discutiremos apenas alguns exemplos das funções das lectinas na natureza. Em laboratório, lectinas purificadas, normalmente, são usadas como reagentes para detecção e separação de glicoproteínas com composições oligossacarídicas diferentes.

Tabela 9-3 – As lectinas e os seus oligossacarídeos ligantes

Família de lectina	Abreviatura	Ligante(s)
Planta		
Concanavalina A	ConA	Manα1—OCH_3
Griffonia simplicifolia lectina 4	GS4	Lewis b (Le^b) tetrassacarídeo
Aglutinina do germe de trigo	WGA	Neu5Ac(α2→3)Gal(β1→4)Glc GlcNAc(β1→4)GlcNAc
Ricina		Gal(β1→4)Glc
Animal		
Galectina-1		Gal(β1→4)Glc
Proteína A ligada a manose	MBP-A	Grande quantidade de octassacarídeo de manose
Viral		
Hemaglutinina do vírus influenza	HA	Neu5Ac(α2→6)Gal(β1→4)Glc
Proteína 1 do vírus polioma	VP1	Neu5Ac(α2→3)Gal(β1→4)Glc
Bacteriano		
Enterotoxina	LT	Gal
Toxina colérica	TC	Pentassacarídeo GM1

Fonte: Weiss WI & Drickarmes K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441-473.

As unidades de ácido siálico (Neu5Ac), encontradas nas extremidades das cadeias de oligossacarídeos de muitas glicoproteínas do plasma (Fig. 9-25), protegem essas proteínas da captação e degradação no fígado. Por exemplo, a ceruloplasmina, uma glicoproteína transportadora de átomos de cobre, tem várias cadeias oligossacarídicas com unidades de ácido siálico terminal. A remoção dessas unidades pela enzima sialidase é uma forma pela qual o corpo marca proteínas "velhas" para destruição e reposição. A membrana plasmática dos hepatócitos tem moléculas de lectinas (receptores de asialoglicoproteína; "asialo-" indica ausência de ácido siálico) que ligam especificamente cadeias oligossacarídicas com unidades de galactose não "protegidas" por unidades de ácido siálico terminal. A interação ceruplasmina-receptor desencadeia a endocitose e a destruição da ceruplasmina.

Um mecanismo similar é aparentemente responsável pela remoção de eritrócitos envelhecidos do sistema circulatório de mamíferos. Eritrócitos recém-sintetizados têm várias glicoproteínas de membrana com cadeias de oligossacarídeos que terminam em ácido siálico. Quando amostras de sangue são tratadas com sialidase, *in vitro*, o resíduo de ácido siálico é removido. A amostra é reintroduzida na circulação, os eritrócitos tratados com a enzima desaparecem da corrente sangüínea em poucas horas, enquanto células com oligossacarídeos (eritrócitos retirados e reintroduzidos sem tratamento com sialidase) intactos continuam a circular por muitos dias.

Alguns hormônios peptídeos que circulam no sangue têm oligossacarídeos na sua composição que influenciam fortemente seu tempo de circulação. Hormônio luteinizante e tirotrofina (hormônios peptídeos produzidos no córtex adrenal) têm oligossacarídeos *N*-ligados que terminam com um dissacarídeo $GalNAc4SO_3^-$ (β1→4)GlcNAc, que é reconhecido por uma lectina (receptor) dos hepatócitos. A $GalNAc4SO_3^-$ é uma *N*-acetilgalactosamina sulfatada no grupo —OH do C-4. A interação receptor-hormônio medeia a captação e a destruição do hormônio luteinizante e da tirotrofina, reduzindo suas concentrações no sangue. Então, os níveis sangüíneos desses hormônios sofrem aumentos (devido à secreção da glândula adrenal) e quedas (devido à destruição pelos hepatócitos) periódicas.

Selectinas são uma família de lectinas, encontradas nas membranas plasmáticas, que medeiam o reconhecimento célula-célula e a adesão em vários processos celulares. Um desses processos é o movimento das células imunes (linfócitos T) através da parede do capilar, do sangue para os tecidos, nos locais de infecção ou inflamação (Fig. 9-27). No local de infecção, a selectina P da superfície das células endoteliais dos capilares interage com um oligossacarídeo específico das glicoproteínas dos linfócitos T circulantes. Essa interação diminui a velocidade das células T devido à adesão e à rolagem destas ao longo do revestimento endotelial dos capilares. Uma segunda interação entre as moléculas de integrina na membrana plasmática das células T e uma proteína de adesão na superfície das células endoteliais, agora, pára as células T e permite seu movimento através da parede do capilar para os tecidos infectados para iniciar a resposta imune. Duas outras selectinas participam nesse processo: selectina E nas células endoteliais e selectina L nas células T que se ligam por meio de seus oligossacarídeos cognatos, uma a outra.

Alguns patógenos microbianos têm lectinas que medeiam a adesão bacteriana nas células hospedeiras ou a entrada da toxina nas células. A bactéria que se supõe ser a responsável por muitas úlceras gástricas, *Helicobacter pylori*, adere à superfície interna do estômago pelas interações entre as lectinas na superfície da bactéria e os oligossacarídeos específicos das glicoproteínas da membrana das células epiteliais gástricas (Fig. 9-28). Entre os sítios de ligação, está o oligossacarídeo Le^b reconhecido pelo *H. pylori*, quando ele é parte do determinante do grupo sangüíneo O. Esta observação ajuda a explicar o porquê da incidência várias vezes maior de úlcera gástrica em pessoas do tipo sangüíneo O que naquelas do tipo A e B. Análogos do oligossacarídeo Le^b, sintetizados quimicamente, podem tornar-se um tratamento útil para esse tipo de úlcera. Administrados por via oral, eles podem prevenir a adesão bacteriana (e assim a infecção) pela competição com a glicoproteína gástrica pela ligação na lectina bacteriana.

A molécula de toxina colérica (produzida pelo *Vibrio cholerae*) desencadeia diarréia depois da entrada nas células intestinais, responsáveis pela absorção de água do intestino. Ela se liga na célula-alvo por meio do oligossacarídeo do gangliosídeo GM1, um fosfolipídio de membrana (veja Adendo 11-2, Fig. 1), na superfície das células epiteliais do intestino. Similarmente, a toxina pertussis, produzida pela *Bordetella pertussis*, a bactéria que causa a coqueluche, penetra na célula-alvo somente depois de interagir com um oligossacarídeo (ou talvez vários oligossacarídeos) com uma unidade de ácido siálico terminal. Entendendo detalhes dos sítios de ligação dos oligossacarídeos dessas toxinas (lectinas), pode-se permitir a produção de toxinas análogas, desenvolvidas por engenharia genética, para uso em vacinas. As toxinas análogas modificadas geneticamente perdem o sítio de ligação para o carboidrato, podendo ser inofensivas porque não

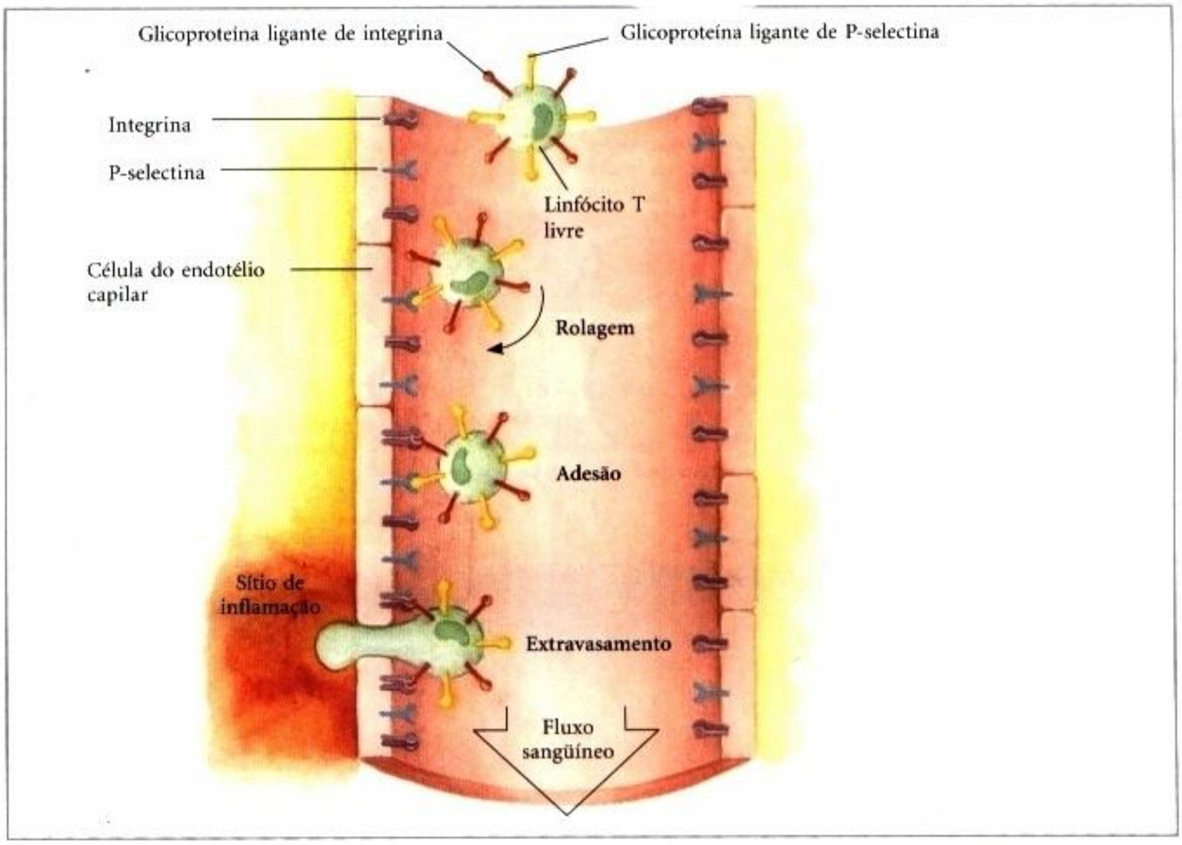


Figura 9-27 – Função das interações lectina-ligante no movimento de linfócitos nos sítios de uma infecção ou lesão. A circulação de um linfócito T através de um capilar é diminuída pelas interações transitórias entre as moléculas de selectina P da membrana plasmática das células endoteliais do capilar e as proteínas com sítios de ligação para selectina P na superfície das células T. Por meio dessas interações com as moléculas de selectina P sucessivas, as células T rolam ao longo da superfície do capilar. Próximo ao sítio de inflamação, interações fortes entre integrina da superfície do capilar e seus ligantes na superfície de célula T conduzem a uma firme adesão. As células T param a rolagem e, sob a influência de sinais enviados de fora do sítio de inflamação, inicia-se um extravasamento através da parede do capilar — com isso, movem-se em direção ao sítio de inflamação.

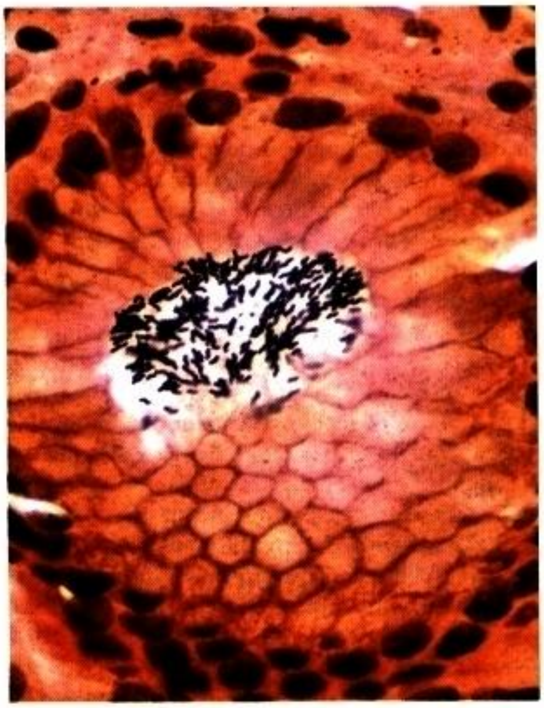


Figura 9-28 – As células de *Helicobacter pylori* aderidas à superfície gástrica. Essa bactéria causa úlcera pelas interações entre a lectina da superfície da bactéria e o oligossacarídeo Le^b (um antígeno de grupo sangüíneo) do epitélio gástrico.

podem ligar e entrar nas células, mas elas podem elicitar uma resposta imune que poderia proteger o recipiente quando exposto à toxina natural.

Várias viroses animais, incluindo o vírus da influenza, ligam-se a suas células hospedeiras por meio de interações com oligossacarídeos expostos na superfície da célula do hospedeiro. A lectina do vírus da influenza é a proteína HA, a qual descreveremos no Capítulo 12. A proteína HA é essencial para a entrada e a infecção viral (veja págs. 313-316 e Fig. 12-21a).

A Figura 9-29 resume os tipos de interações biológicas que são mediadas por ligação a carboidratos.

Análise de Carboidratos

A crescente tomada de consciência da importância da estrutura de oligossacarídeos no reconhecimento biológico tem sido o promotor do desenvolvimento de métodos de análise da estrutura e estereoquímica de oligossacarídeos complexos. A análise de oligossacarídeos é complicada pelo fato de que, diferentemente dos ácidos nucléicos e proteínas, os oligossacarídeos podem ser ramificados e unidos por uma variedade de ligações. Para serem analisados, os oligossacarídeos são geralmente removidos das proteínas ou lipídios conjugados e então submetidos a etapas de degradação com reagentes específicos que revelam a posição das ligações ou a estereoquímica. A espectrometria de massa e a espectroscopia RMN também têm se tornado inestimáveis para decifrar a estrutura de oligossacarídeos.

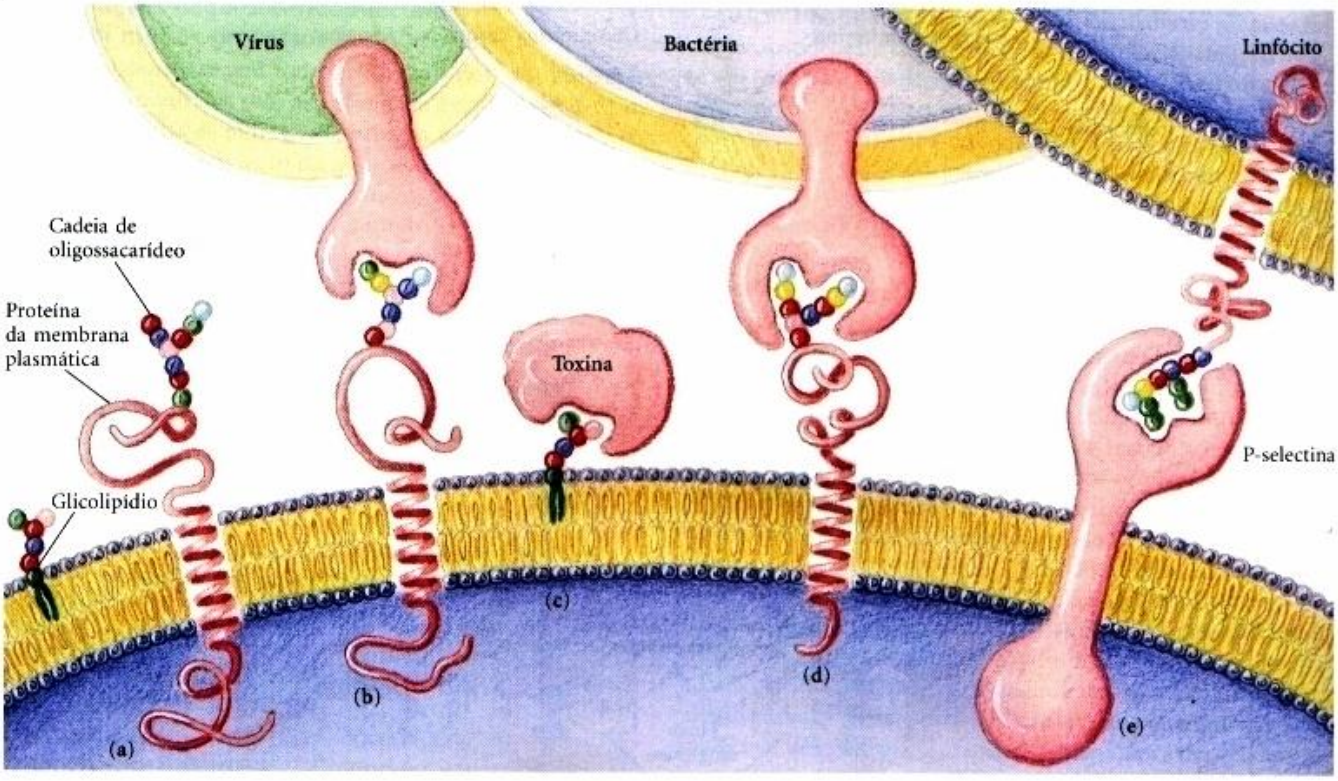


Figura 9-29 – Funções dos oligossacarídeos no reconhecimento e na adesão à superfície da célula. (**a**) Os oligossacarídeos com estruturas únicas (representados por uma cadeia de bolas coloridas), componentes de uma variedade de glicoproteínas ou glicolipídios na superfície externa da membrana plasmática, interagem com alta especificidade e afinidade com as lectinas do meio extracelular. (**b**) As viroses que infectam as células animais, tais como o vírus da influenza, ligam-se às glicoproteínas na célula como primeira etapa de infecção. (**c**) Toxinas bacterianas, tais como a toxina pertussis e colérica, ligam-se a um glicolipídio de superfície antes de entrar na célula. (**d**) Algumas bactérias, tais como *Helicobacter pylori*, aderem para, então, colonizar ou infectar as células animais. (**e**) As lectinas chamadas selectinas da membrana plasmática de certas células medeiam as interações célula-célula, tais como as dos linfócitos T com células endoteliais da parede dos capilares no sítio de infecção.

Os oligossacarídeos componentes de glicoproteínas ou glicolipídios podem ser liberados por enzimas purificadas — glicosidases que removem especificamente oligossacarídeos *O* ou *N*-ligados, ou lipases que removem os grupos lipídicos da cabeça. As misturas de carboidratos são fracionadas em seus componentes individuais (Fig. 9-30) por muitas das mesmas técnicas utilizadas na separação de proteínas e aminoácidos: precipitação fracionada com solventes, cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel (exclusão molecular) (veja Fig. 5-18). As lectinas altamente purificadas, ligadas covalentemente a um suporte insolúvel, são comumente usadas na cromatografia de afinidade de carboidratos (veja Fig. 5-18c). A hidrólise de oligossacarídeos e polissacarídeos em solução de ácido forte libera uma mistura de monossacarídeos que, depois da conversão para derivados voláteis convenientes, pode ser separada, identificada e quantificada por cromatografia gás-líquida (veja pág. 298), esclarecendo a composição completa do polímero. Por exemplo, para polímeros lineares simples como a amilose, as posições das ligações glicosídicas entre os monossacarídeos são determinadas pelo tratamento do polissacarídeo intacto com iodeto de metila em meio fortemente básico para converter todas as hidroxilas livres para os respectivos éteres metílicos, que são estáveis em meio ácido, então o polissacarídeo metilado é hidrolisado em meio ácido. Somente os grupos hidroxila livres presentes no monossacarídeo resultante são aqueles que estavam envolvidos nas ligações glicosídicas. Para determinar a seqüência das unidades monossacarídicas, incluindo ramificações se elas estiverem presentes, são utilizadas exoglicosidases de especificidade conhecida, para remover as unidades uma de cada vez do terminal(is) não-redutor(es). A especificidade dessas exoglicosidases freqüentemente permite deduzir a posição e a estereoquímica das ligações.

A análise dos oligossacarídeos está cada vez mais ligada à espectroscopia de RMN de alta resolução e espectrometria de massa. As análises de RMN isoladas, especialmente para oligossacarídeos de tamanho médio, podem fornecer muitas informações sobre a seqüência, a posição da ligação e a configuração do carbono anomérico. Os polissacarídeos e os oligossacarídeos grandes podem ser tratados quimicamente ou com endoglicosidases para romper ligações glicosídicas internas específicas, produzindo vários oligossacarídeos menores, mais facilmente analisáveis. Processos automáticos e instrumentos comerciais são usados para as determinações de rotina da estrutura de oligossacarídeos, mas a seqüência de ramificação dos oligossacarídeos unidos por mais de um tipo de ligação continua sendo um problema mais interessante do que determinar a seqüência linear de proteínas e ácidos nucléicos, os quais têm monômeros ligados apenas por um tipo de ligação.

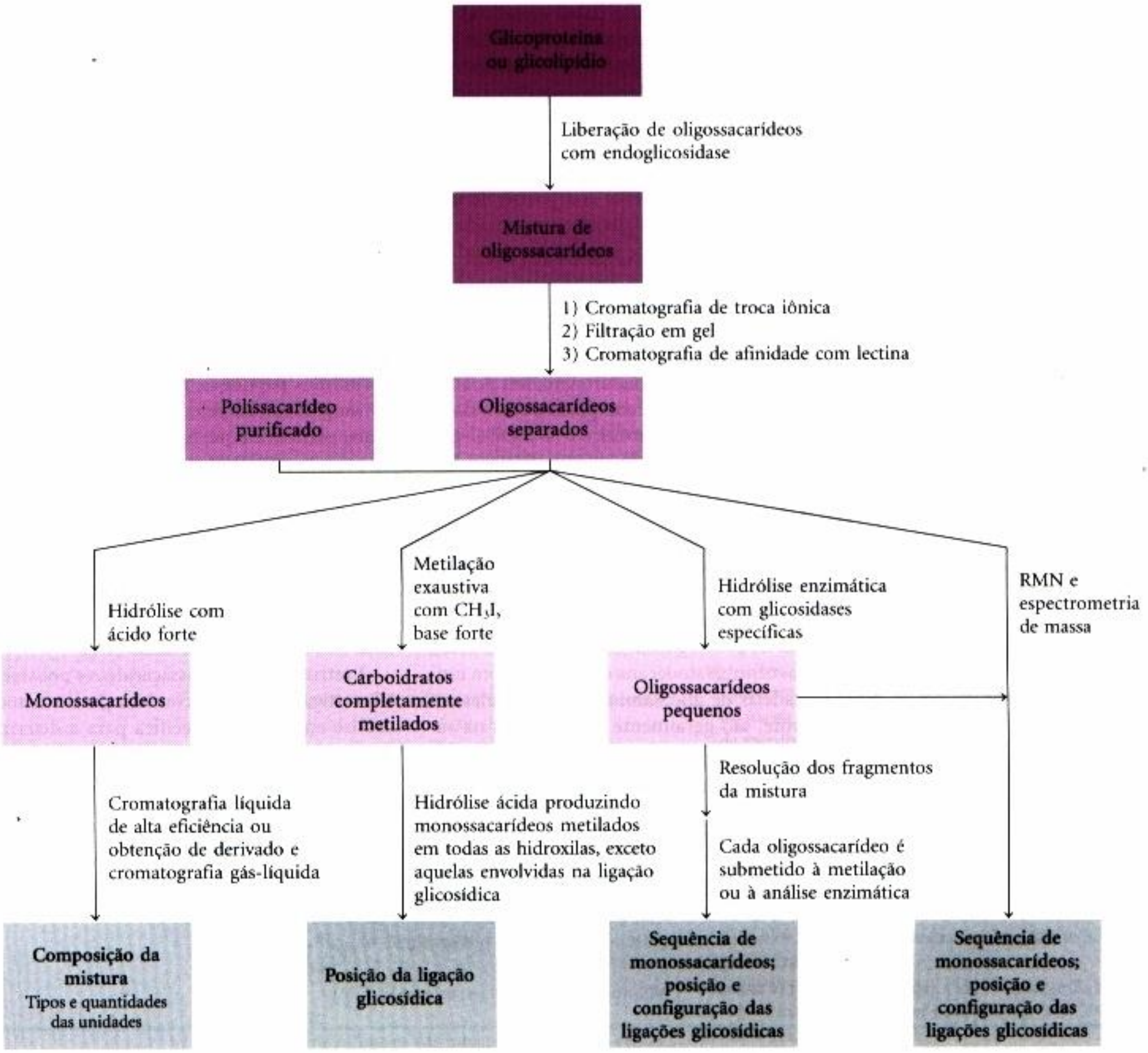

Glicoproteína ou glicolipídio
Liberação de oligossacarídeos com endoglicosidase
Mistura de oligossacarídeos
1) Cromatografia de troca iônica
2) Filtração em gel
3) Cromatografia de afinidade com lectina
Polissacarídeo purificado
Oligossacarídeos separados
Hidrólise com ácido forte
Metilação exaustiva com CH_3I, base forte
Hidrólise enzimática com glicosidases específicas
RMN e espectrometria de massa
Monossacarídeos
Carboidratos completamente metilados
Oligossacarídeos pequenos
Cromatografia líquida de alta eficiência ou obtenção de derivado e cromatografia gás-líquida
Hidrólise ácida produzindo monossacarídeos metilados em todas as hidroxilas, exceto aquelas envolvidas na ligação glicosídica
Resolução dos fragmentos da mistura
Cada oligossacarídeo é submetido à metilação ou à análise enzimática
Composição da mistura
Tipos e quantidades das unidades
Posição da ligação glicosídica
Sequência de monossacarídeos; posição e configuração das ligações glicosídicas
Sequência de monossacarídeos; posição e configuração das ligações glicosídicas

Figura 9-30 – Métodos de análise de carboidratos. Um carboidrato purificado no primeiro estágio da análise freqüentemente requer todas as quatro seqüências analíticas para completar a sua caracterização.

Resumo

Os carboidratos são predominantemente poliidroxialdeídos ou cetonas cíclicos, que ocorrem na natureza como monossacarídeos (aldoses ou cetoses), oligossacarídeos (várias unidades de monossacarídeos) e polissacarídeos (moléculas grandes contendo muitas unidades monossacarídicas e com estrutura linear ou ramificada). Os monossacarídeos que têm, no mínimo, um átomo de carbono assimétrico, podem existir em formas estereoisoméricas. Os açúcares de ocorrência natural mais comuns como ribose, glicose, frutose e manose são da série D. Açúcares simples tendo quatro ou mais átomos de carbono podem existir como hemiacetais ou hemicetais, quer na forma furanosídica (anel de cinco elementos), quer na forma piranosídica (anel de seis elementos). As furanoses e as piranoses ocorrem nas formas anoméricas α e β, que são interconversíveis pelo processo de mutarrotação. Os açúcares com carbonos anoméricos livres oxidáveis são chamados de açúcares redutores. Muitos derivados dos açúcares simples são encontrados nas células vivas, incluindo-se neles os açúcares aminados e seus derivados acetilados e os ácidos aldônicos e urônicos. Os grupos hidroxila das unidades de monossacarídeos podem também formar ésteres de fosfato e sulfato. Os dissacarídeos consistem de dois monossacarídeos unidos por ligação glicosídica.

Os polissacarídeos (glicanos) contêm muitas unidades de monossacarídeos unidas por ligação glicosídica. Alguns funcionam como formas de armazenamento de carboidratos (amido e glicogênio), com alta massa molecular, polímeros ramificados de glicose com ligações ($\alpha1\rightarrow4$) na cadeia principal e ($\alpha1\rightarrow6$) nos pontos de ramificação. Outros polissacarídeos desempenham um papel estrutural nas paredes celulares e nos exoesqueletos. A celulose (em plantas) tem as unidades de D-glicose unidas por ligação (β1→4); a quitina (em exoesqueletos de insetos) é um polissacarídeo linear de unidades de *N*-acetilglucosamina unidas por ligação (β1→4). As paredes celulares bacterianas contêm peptideoglicanos, polissacarídeos lineares compostos de unidades alternadas de *N*-acetilglucosamina e ácido *N*-acetilmurâmico, interligados por cadeias peptídicas curtas. A matriz extracelular que envolve as células nos tecidos animais contém uma variedade de glicosaminoglicanos, polímeros lineares que alternam unidades de açúcares aminados e ácido urônico. Entre estes está incluído o hialuronato, um polímero de alta massa molecular, composto por unidades alternadas de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina, e uma variedade de heteropolissacarídeos menores, sulfatados e muito ácidos, tais como heparana sulfato, condroitina sulfato, queratana sulfato e dermatana sulfato.

Muitos dos oligossacarídeos na célula são glicoconjugados — moléculas híbridas nas quais a porção carboidrato é covalentemente ligada a proteína ou a lipídio. Os proteoglicanos, proteínas (tais como as proteínas centrais sindecana e agrecana) com uma ou mais cadeias de glicosaminoglicano ligadas covalentemente, são geralmente encontrados na superfície externa das células ou na matriz extracelular. Na maioria dos tecidos, a matriz extracelular contém uma variedade de proteoglicanos e proteínas multiadesivas tais como fibronectina, bem como proteínas agregadas enormes consistindo de muitos proteoglicanos ligados não-covalentemente a uma única e grande molécula de hialuronato.

As glicoproteínas possuem oligossacarídeos covalentemente ligados que são menores, porém de estruturas mais complexas, além disso, mais ricos em informação do que os glicosaminoglicanos. Muitas proteínas da superfície da célula ou extracelulares são glicoproteínas, como a maioria das proteínas secretadas. A porção carboidrato serve como marcadores (rótulos) biológicos, que são lidos pelas lectinas, proteínas que ligam cadeias de oligossacarídeos com alta afinidade e seletividade. As interações entre lectinas e oligossacarídeos específicos são fundamentais para adesão e reconhecimento célula-célula. Em vertebrados, os oligossacarídeos sinalizadores determinam a taxa de degradação de certos hormônios peptídeos, proteínas circulantes e células sangüíneas. As selectinas são lectinas da membrana plasmática que ligam cadeias de carboidratos na matriz extracelular ou na superfície de outras células, assim mediando o fluxo de informações entre a célula e a matriz, ou entre células. A adesão de patógenos virais e bacterianos (incluindo *Helicobacter*, o cólera, toxinas pertussis e vírus da influenza) em suas células-alvo animal ocorre por meio da ligação de lectinas dos patógenos a oligossacarídeos da superfície das células-alvo.

A estrutura dos oligossacarídeos e polissacarídeos é investigada por uma combinação de métodos: hidrólise enzimática específica para a determinação de sua estereoquímica e produção de fragmentos mais simples para análise posterior; análise por metilação para localizar as ligações glicosídicas; espectrometria de massa, degradação seqüenciada e espectroscopia de RMN para determinar as seqüências; e RMN de alta resolução para estabelecer configurações nos carbonos anoméricos.

Leitura Adicional

Conhecimento geral em química de carboidratos

Aspinall GO (ed). (1982, 1983, 1985) *The Polysacharides*, Vols 1-3, Academic Press, Inc., New York.

Collins PM & Ferrier RJ. (1995) *Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley & Sons, Chichester, England.

Um texto acessível para alunos de graduação.

Fukuda M & Hindsgaul O. (1994) *Molecular Glycobiology*, IRL Press at Oxford University Press, Inc., New York.

Um completo e avançado tratamento da química e da biologia de carboidratos da superfície celular. Bom capítulo sobre lectinas, reconhecimento de carboidratos na interação célula-célula e síntese química de oligossacarídeos.

Lehmann J (Haines AH, trans.). (1998) *Carbohydrates: Structure and Biology*, G. Thieme, Verlag, New York.

Os fundamentos da química e da biologia de carboidratos apresentados de maneira adequada para estudantes avançados de pós-graduação e graduação.

Melendez-Hevia E, Waddell TG, & Shelton ED. (1993) Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* **295**, 477-483.

Morrison RT & Boyd RN. (1992) *Organic Chemistry*, 6th edn, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.

Os capítulos 34 e 35 abrangem a estrutura, a estereoquímica, a nomenclatura e as reações químicas dos carboidratos.

Pigman W & Horton D (eds). (1970, 1972, 1980) *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*, Vols. IA, IB, IIA, and IIB, Academic Press, Inc., New York.

Artigos compreensíveis em química dos carboidratos.

Glicosaminoglicanos e proteoglicanos

Carney SL & Muir H. (1988) The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol. Rev.* **68**, 858-910.

Uma revisão mais avançada.

Iozzo RV. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609-652.

Uma revisão focalizada nos mais recentes estudos em genética e biologia molecular dos proteoglicanos de matriz. A relação estrutura-função de alguns proteoglicanos-modelo é discutida em profundidade e novos aspectos de sua biologia são examinados.

Jackson RL, Busch SJ, & Cardin AD. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 71, 481-539.

Uma revisão avançada da química e da biologia dos glicosaminoglicanos.

Glicoproteínas

Gahmberg CG & Tolvanen M. (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 308-311.

Kobata A. (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **209**, 483-501.

Opdenakker G, Rudd P, Ponting C, & Dwek R. (1993) Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.* 7, 1330-1337.

Uma revisão que considera os genes das glicoformas, o papel funcional da glicosilação e a relação estrutura-função de várias glicoproteínas.

Varki A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130.

Lectinas, reconhecimento e adesão

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, & Juliano RL. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**, 197-263.

Borén T, Normark S, & Falk P. (1994) *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **2**, 221-228.

Uma visão da função dos oligossacarídeos que determinam os tipos sangüíneos, na adesão desses microrganismos no revestimento do estômago produzindo úlceras.

Corntejo CJ, Winn RK, & Harlan JM. (1997) Anti-adhesion therapy. *Adv. Pharmacol.* **39**, 99-142.

Análogos de oligossacarídeos de reconhecimento são usados para bloquear a adesão de um patógeno na célula-alvo do hospedeiro.

Hooper LA, Manzella SM, & Baenziger JU. (1996) From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *FASEB J.* **10**, 1137-1146.

Ênfase para as funções dos oligossacarídeos sulfatados na meia-vida de hormônios peptídeos, interações simbiontes na fixação de nitrogênio em legumes e destino de linfócitos.

Horwitz AF. (1997) Integrins and health. *Sci. Am.* **276** (May), 68-75.

Artigo sobre a função das integrinas na adesão célula-célula e as possíveis funções na artrite, doenças do coração, derrame cerebral, osteoporose e metástase do câncer.

Leahy DJ. (1997) Implications of atomic-resolution structures for cell adhesion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 363-393.

Essa revisão curta descreve várias estruturas determinadas recentemente de moléculas de adesão da célula, resume algumas das principais descobertas sobre cada estrutura e enfatiza aspectos comuns dos diferentes sistemas de adesão da célula.

McEver RP, Moore KL, & Cummings RD. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interations *J. Biol. Chem.* **270**, 11.025-11.028.

Uma revisão curta que focaliza a interação das selectinas com seus carboidratos ligantes.

Sharon N & Lis H. (1993) Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* **268** (January), 82-89.

Bases químicas e funções biológicas do reconhecimento de carboidratos.

Varki A. (1997) Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.* **11**, 248-255.

Weiss WI & Drickamer K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441-473.

Bom tratamento das bases químicas das interações carboidrato-proteína.

Análise de carboidratos

Chaplin MF & Kennedy JF (eds). (1994) *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, 2nd edn, IRL Press, Oxford.

Manual muito útil para análise de todos os tipos de moléculas contendo açúcares — monossacarídeos, polissacarídeos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídios.

Dwek RA, Edge CJ, Harvey DJ, & Wormald MR. (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 65-100.

Excelente visão geral do uso de RMN, espectrometria de massa e sistemas enzimáticos para a determinação da estrutura de oligossacarídeos.

Fukuda M & Kobata A. (1993) *Glycobiology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.

Um manual de práticas para isolamento e caracterização da porção oligossacarídica de glicoproteínas, utilizando amplamente as técnicas modernas.

Jay A. (1996) The methylation reaction in carbohydrate analysis. *J. Carbohydr. Chem.* **15**, 897-923.

Uma descrição completa das análises de metilação de carboidratos.

Lennarz WJ & Hart GW (eds). (1994) *Guide to Techniques in Glycobiology*, Methods in Enzymology, Vol. 230, Academic Press, Inc., New York.

Guia prático de trabalho com carboidratos.

McCleary BV & Matheson NK. (1986) Enzymic analysis of polysaccharide structure. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **44**, 147-276.

Trata sobre o uso de enzimas purificadas na análise da estrutura e da estereoquímica.

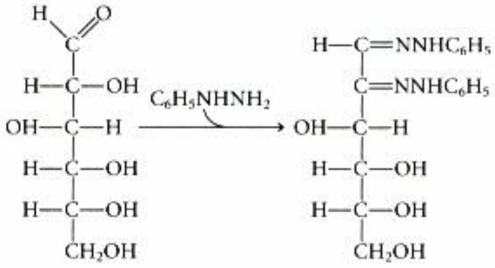
Rudd PM, Guile GR, Kuester B, Harvey DJ, Opdenakker G & Dwek RA. (1997) Oligosaccharide sequencing technology. *Nature* **388**, 205-207.

Problemas

1. Determinação da fórmula empírica. Uma substância desconhecida contendo apenas C, H e O foi isolada do fígado do ganso. Uma amostra de 0,423g produziu 0,620g de CO_2 e 0,254g de H_2O depois de combustão completa na presença de oxigênio em excesso. A fórmula empírica dessa substância é consistente com o fato de ela ser um carboidrato? Explique.

2. Álcoois-açúcares. Nos monossacarídeos derivados conhecidos como álcoois-açúcares, o oxigênio da carbonila é reduzido a hidroxila. Por exemplo, o D-gliceraldeído pode ser reduzido a glicerol. Entretanto, esse álcool-açúcar não é designado pela nomenclatura D ou L. Por quê?

3. Ponto de fusão de osazonas derivadas de monossacarídeos. Muitos carboidratos reagem com fenilidrazina ($C_6H_5NHNH_2$) para formar derivados cristalinos amarelo-brilhantes conhecidos como osazonas:



Glicose

Osazona derivada da glicose

A temperatura de fusão desses derivados é facilmente determinada e é característica para cada osazona. Essa informação foi usada para ajudar a identificar monossacarídeos antes do desenvolvimento do HPLC ou cromatografia gás-líquida. No quadro a seguir estão listados os pontos de fusão (PF) de alguns derivados aldose-osazona.

Monossacarídeo	PF do monossacarídeo anidro (°C)	PF da osazona derivada (°C)
Glicose	146	205
Manose	132	205
Galactose	165-168	201
Talose	128-130	201

Como a tabela mostra, certos pares de derivados têm o mesmo ponto de fusão, embora os monossacarídeos de origem não o tenham. Por que a glicose e a manose e a galactose e a talose formam derivados osazonas com o mesmo ponto de fusão?

4. Interconversão das formas de D-galactose. Uma solução de um estereoisômero de um dado monossacarídeo fará girar a luz plano-polarizada para a esquerda (sentido anti-horário), é chamada de isômero levorrotatório e designada pelo sinal (–); outro estereoisômero fará a luz plano-polarizada girar o mesmo número de graus, porém para a direita (sentido horário), este é chamado de isômero dextrorrotatório e designado pelo sinal (+). Uma mistura equimolecular das formas (+) e (–) não fará a luz plano-polarizada girar.

A atividade óptica de um estereoisômero é expressa quantitativamente por sua *rotação óptica*, o número de graus que a luz plano-polarizada é girada quando passa através do passo óptico de um dado comprimento de uma solução do composto em uma dada concentração. A *rotação específica* $[\alpha]_D^{25^\circ C}$ de um composto opticamente ativo é definida como:

$$[\alpha]_D^{25^\circ C} = \frac{\text{rotação óptica observada }(^\circ)}{\text{comprimento do passo óptico (dm)} \times \text{concentração (g/mL)}}$$

A temperatura da solução e o comprimento de onda da luz empregada (geralmente a linha D do espectro de emissão do sódio, 589nm) precisam ser especificados na definição.

Uma solução recém-preparada de α-D-galactose (1g/mL em uma cubeta de 10cm de passo óptico) mostra rotação óptica igual a +150,7°. Quando deixada em repouso por um longo período de tempo, a rotação decresce gradualmente até atingir um valor de equilíbrio igual a +80,2°. Em contraste, uma solução recém-preparada (1g/mL) da forma β mostra uma rotação óptica de apenas +52,8°. Quando essa solução é deixada em repouso por várias horas, a rotação aumenta até o valor de equilíbrio igual a +80,2°, valor idêntico ao atingido pela α-D-galactose.

(a) Desenhe as fórmulas em perspectiva de Haworth para as formas α e β da D-galactose. Qual característica distingue as duas formas?

(b) Por que a rotação de uma solução recém-preparada da forma α decresce gradualmente com o tempo? Explique. Por que soluções (de concentrações iguais) das formas α e β atingem o mesmo valor de rotação óptica no equilíbrio?

(c) Calcule a composição percentual das duas formas de D-galactose no equilíbrio.

5. O sabor do mel. A frutose no mel está, principalmente, na forma de β-D-piranose. Esta é uma das substâncias mais doces conhecidas, cerca de duas vezes mais doce que a glicose. A forma de β-D-furanose da frutose é menos doce. A doçura do mel gradualmente diminui em altas temperaturas. Também xarope de milho com alta concentração de frutose (um produto comercial no qual a maioria das glicoses são convertidas em frutose) é usado como adoçante em bebidas *geladas*, mas não nas *quentes*. Qual a propriedade química da frutose que pode justificar essas duas observações?

6. A glicose oxidase na determinação da glicose sangüínea. A enzima glicose oxidase isolada do fungo *Penicillium notatum* catalisa a oxidação de β-D-glicose para D-glicono-δ-lactona. Essa enzima é altamente específica para o anômero β da glicose e não afetará o anômero α. A despeito dessa especificidade, a reação catalisada pela glicose oxidase é comumente empregada em ensaios clínicos para a determinação da glicose total no sangue, isto é, soluções consistindo de uma mistura de β e α-D-glicose. Por que isso é possível? Além de permitir a detecção de quantidades muito pequenas de glicose, qual vantagem a glicose oxidase oferece sobre a reação de Fehling para a determinação da glicose sangüínea?

7. A enzima invertase "inverte" a sacarose. A hidrólise da sacarose (rotação específica +66,5°) libera uma solução equimolecular de D-glicose (rotação específica +52,5°) e D-frutose (rotação específica –92°).

(a) Sugira uma maneira para determinar a velocidade de hidrólise da sacarose por meio de uma preparação enzimática extraída do revestimento interno do intestino delgado de mamíferos.

(b) Explique por que uma mistura equimolecular de D-glicose e D-frutose formada pela hidrólise da sacarose é chamada de açúcar invertido pelas pessoas que trabalham na indústria de alimentos.

(c) A enzima invertase (atualmente seu nome preferido é sacarase) é deixada agir sobre uma solução de sacarose até que a rotação óptica da solução atinja o valor zero. Que fração da sacarose foi hidrolisada?

8. Manufatura de chocolates recheados com líquidos. A manufatura de chocolates contendo líquidos em seu interior é uma aplicação interessante da engenharia enzimática. O líquido aromatizado contido no interior deles consiste quase exclusivamente de uma solução aquosa de açúcares, rica em frutose para ser doce. O dilema técnico é o seguinte: a cobertura de chocolate precisa ser preparada despejando-se o chocolate fundido ainda quente sobre a porção central sólida (ou quase sólida), embora o produto final deva ter a porção central líquida e rica em frutose. Sugira uma maneira para resolver esse problema. (Indicação: a sacarose é muito menos solúvel que uma mistura de glicose e frutose.)

9. Anômeros da sacarose? Embora a lactose exista em duas formas anoméricas, nenhuma forma anomérica da sacarose foi ainda descrita. Por quê?

10. Propriedades físicas da celulose e do glicogênio. A maior parte da celulose pura obtida das fibras da semente de plantas do gênero *Gossypium* (algodão) é resistente, fibrosa e completamente insolúvel na água. Diferentemente, o glicogênio obtido do fígado ou dos músculos de animais dissolve-se rapidamente em água quente formando uma solução opalescente. Embora ambos tenham propriedades físicas marcadamente diferentes, as duas substâncias são compostas por moléculas de D-glicose polimerizadas por meio de ligações (1→4) e têm pesos moleculares comparáveis. Quais características estruturais provocam essas propriedades físicas tão diferentes dos dois polissacarídeos? Explique as vantagens biológicas de suas respectivas propriedades físicas.

11. Velocidade de crescimento do bambu. O caule do bambu pode crescer à velocidade fantástica de até 0,3m/dia sob condições adequadas. Dado que esse caule é composto quase exclusivamente por fibras de celulose orientadas na direção do crescimento, calcule o número de unidades de açúcar que precisam ser adicionadas, por segundo, pelas enzimas que promovem o crescimento das cadeias de celulose, para proporcionar o referido crescimento do bambu. Cada unidade de D-glicose na molécula de celulose tem um comprimento aproximado de 0,45nm.

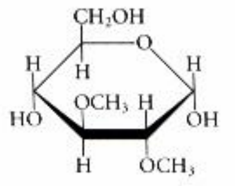
12. O glicogênio como reservatório de energia: por quanto tempo uma ave pode voar? Desde tempos muito antigos sabe-se que certas aves de predileção dos caçadores (aves de caça) como o galo silvestre, a perdiz e os faisões fatigam-se facilmente. O historiador grego Xenofonte (434-355 a.C.) escreveu: "Os betardos . . . podem ser apanhados por alguém que seja rápido em persegui-los, pois eles, como as perdizes, voam apenas por pequenas distâncias e logo ficam cansados, e sua carne é deliciosa". Os músculos das asas dessas aves de caça dependem quase inteiramente da quebra metabólica da glicose-1-fosfato para obter a energia que necessitam na forma de ATP (veja Capítulo 15). Nessas aves, a glicose-1-fosfato é formada pela quebra do glicogênio armazenado por meio da ação da enzima fosforilase do glicogênio. A velocidade de produção do ATP é limitada pela velocidade com que o glicogênio pode ser quebrado. Durante um "vôo em pânico", a velocidade de quebra do glicogênio na ave é muito alta, aproximadamente 120μmol/min de glicose-1-fosfato são produzidos por grama de tecido muscular úmido. Dado que os músculos das asas contêm perto de 0,35% de glicogênio em massa, calcule por quanto tempo uma dessas aves pode voar.

13. Volume da condroitina sulfato em solução. Uma das funções críticas da condroitina sulfato é agir como lubrificante nas articulações esqueléticas pela criação de um meio geleificado que é resiliente à fricção e ao choque. Essa função parece estar relacionada a uma propriedade característica da condroitina sulfato: o volume ocupado pela molécula é muito maior quando em solução que quando desidratado. Por que o volume ocupado pela molécula da condroitina sulfato é tão maior quando em solução?

14. Interações da heparina. A heparina, um glicosaminoglicano com alta carga negativa, é usada clinicamente como anticoagulante. Ela age ligando-se a várias proteínas plasmáticas, incluindo a antitrombina III, um inibidor da coagulação sangüínea. A heparina liga-se a antitrombina III em uma relação 1:1, esse fato parece causar as mudanças conformacionais na proteína que aumentam muito sua capacidade de inibir a coagulação. Quais resíduos de aminoácidos da antitrombina III estão envolvidos na interação com a heparina?

15. Conteúdo de informação em oligossacarídeos. A porção carboidrato de algumas glicoproteínas pode servir como um sítio de reconhecimento celular. No sentido de perfazer essa função, a porção oligossacarídica das glicoproteínas precisa ter a potencialidade de ocorrer em uma grande variedade de formas. O que pode produzir uma vasta série de estruturas: oligopeptídeos compostos de cinco resíduos de aminoácidos diferentes, ou oligossacarídeos compostos de cinco diferentes unidades monossacarídicos? Explique.

16. Determinação do índice de ramificação da amilopectina. A extensão da ramificação — número de ligações glicosídicas (α1→6) — na amilopectina pode ser determinada pelo procedimento descrito a seguir. Uma amostra pesada de amilopectina é tratada exaustivamente com um agente metilante (iodeto de metila) que substitui todos os hidrogênios das hidroxilas do açúcar por grupos metila, convertendo —OH em —OCH_3. Todas as ligações glicosídicas na amostra tratada são, subseqüentemente, hidrolisadas com ácido diluído e a quantidade de 2,3-di-*O*-metilglicose nessa amostra é determinada.



2,3-Di-*O*-metilglicose

(a) Explique as bases desse método para a determinação do número de ramificação (α1→6) na amilopectina. O que acontece, durante o procedimento descrito, com as unidades de glicose da amilopectina que não estão em pontos de ramificação?

(b) Uma amostra de 258mg de amilopectina tratada como descrito anteriormente produziu 12,4mg de 2,3-di-*O*-metilglicose. Determine a porcentagem de unidades de glicose da amilopectina que contém ligações do tipo (α1→6).

17. Determinação da estrutura de um polissacarídeo. Um polissacarídeo de estrutura desconhecida foi isolado, submetido à metilação exaustiva e hidrolisado. A análise dos produtos revelou três açúcares metilados: 2,3,4-tri-*O*-metil-D-glicose, 2,4-di-*O*-metil-D-glicose, 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glicose, na proporção de 20:1:1. Qual é a estrutura do polissacarídeo?

CAPÍTULO 10

Nucleotídeos e Ácidos Nucléicos

Os nucleotídeos possuem uma variedade de papéis no metabolismo celular. Eles são a moeda energética nas transações metabólicas; os elos químicos essenciais na resposta das células aos hormônios e outros estímulos extracelulares; e os componentes estruturais de uma coleção de co-fatores enzimáticos e intermediários metabólicos. E por último, mas certamente não menos importante, eles são os constituintes dos ácidos nucléicos: ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), as moléculas repositórias da informação genética. A estrutura de cada proteína e, em última análise, cada biomolécula e componente celular é um produto da informação programada na seqüência nucleotídica dos ácidos nucléicos da célula. A habilidade de armazenar e transmitir a informação genética de uma geração para a próxima é uma condição fundamental para a vida.

Este capítulo fornece uma visão geral da natureza química dos nucleotídeos e ácidos nucléicos encontrados na maioria das células; um exame mais detalhado da função dos ácidos nucléicos é o foco da Parte IV deste livro.

Alguns Aspectos Básicos

A seqüência de aminoácidos de cada proteína em uma célula e a seqüência de nucleotídeos de cada molécula de RNA são especificadas pela seqüência do DNA da célula. Um segmento de DNA que contém a informação necessária para a síntese de um produto biológico funcional, seja proteína ou RNA, é referido como um **gene**. Uma célula típica possui muitos milhares de genes, e as moléculas de DNA, nada surpreendentemente, tendem a ser muito longas. O armazenamento e a transmissão da informação biológica são as únicas funções conhecidas do DNA.

Os RNAs possuem uma grande gama de funções, e várias classes são encontradas nas células. Os **RNAs ribossômicos** (rRNA) são componentes estruturais dos ribossomos, os complexos que realizam a síntese de proteínas. Os **RNAs mensageiros** (mRNA) são intermediários que transportam a informação genética de um ou de poucos genes até o ribossomo, no qual as proteínas correspondentes podem ser sintetizadas. Os **RNAs de transferência** (tRNA) são moléculas adaptadoras que traduzem fielmente a informação presente no mRNA em uma seqüência específica de aminoácidos. Além dessas classes principais, há uma grande variedade de RNAs com funções especiais, descrita detalhadamente na Parte IV deste livro.

Os nucleotídeos e os ácidos nucléicos possuem bases e pentoses características

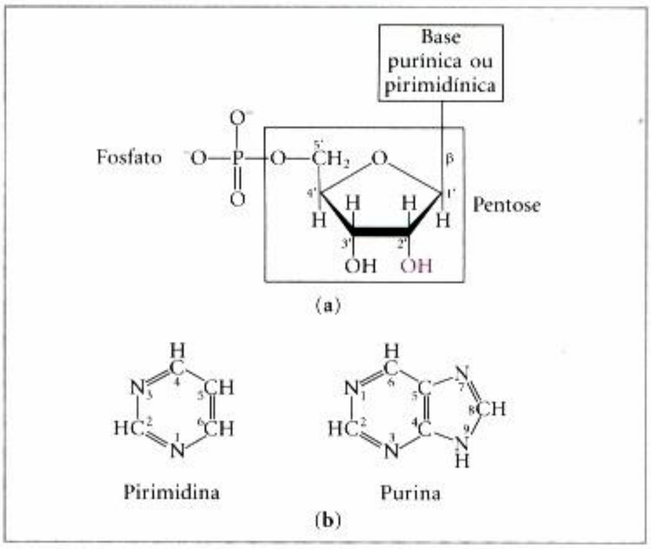


Figura 10-1 – Estrutura dos nucleotídeos. (**a**) Estrutura geral mostrando a convenção da numeração para o anel da pentose. Este é um ribonucleotídeo. Nos desoxirribonucleotídeos o grupo —OH no carbono-2' (em vermelho) é substituído por um —H. (**b**) Os compostos parentais das bases purínicas e pirimidínicas dos nucleotídeos e ácidos nucléicos mostrando as convenções da numeração.

Os **nucleotídeos** possuem três componentes característicos: (1) uma base nitrogenada (contendo nitrogênio), (2) uma pentose e (3) um fosfato (Fig. 10-1). A molécula sem o grupo fosfato é chamada de **nucleosídeo**. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos parentais, **pirimidina** e **purina**. As bases e as pentoses dos nucleotídeos usuais são compostos heterocíclicos. Os átomos de carbono e nitrogênio nas estruturas parentais são numerados convencionalmente, para facilitar a nomeação e a identificação dos muitos compostos derivados. A convenção para o anel da pentose segue as regras descritas no Capítulo 9, entretanto, nas pentoses dos nucleotídeos, os números dos átomos de carbono recebem um apóstrofo (') para distingui-los do número dos átomos das bases nitrogenadas.

A base de um nucleotídeo une-se covalentemente (pelo N-1 das pirimidinas e pelo N-9 das purinas), por meio de uma ligação *N*-β-glicosídica, ao carbono-1' da pentose, e o fosfato está esterificado ao carbono-5'. A ligação *N*-β-glicosídica é formada pela remoção dos elementos da água (um grupo hidroxila da pentose e o hidrogênio da base), como na formação da ligação *O*-glicosídica (veja Fig. 9-25).

Tanto o DNA quanto o RNA contêm duas bases purínicas principais, **adenina** (A) e **guanina** (G), e duas pirimidínicas principais. Em ambos, DNA e RNA, uma das pirimidinas é a **citosina** (C), mas a segunda pirimidina principal é a **timina** (T) no DNA e a **uracila** (U) no RNA. Apenas raramente a timina ocorre no RNA ou a uracila no DNA. As estruturas das cinco principais bases são mostradas na Figura 10-2 e a nomenclatura dos nucleotídeos e nucleosídeos correspondentes está resumida na Tabela 10-1.

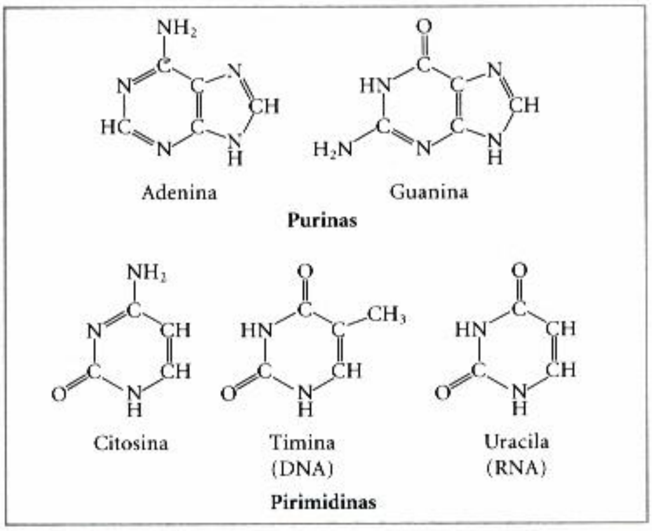


Figura 10-2 – As principais bases purínicas e pirimidínicas dos ácidos nucléicos. Alguns dos nomes comuns destas bases refletem as circunstâncias da sua descoberta. A guanina, por exemplo, foi isolada primeiramente do guano (esterco de pássaro), e a timina foi isolada primeiramente do tecido do timo.

Tabela 10-1 – Nomenclatura dos nucleotídeos e ácidos nucléicos

Base	Nucleosídeo*	Nucleotídeo*	Ácido nucléico
Purinas			
Adenina	Adenosina	Adenilato	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato	DNA
Guanina	Guanosina	Guanilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato	DNA
Pirimidinas			
Citosina	Citidina	Citidilato	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidilato	DNA
Timina	Timidina ou desoxitimidina	Timidilato ou desoxitimidilato	DNA
Uracila	Uridina	Uridilato	RNA

**Nucleosídeos* e *nucleotídeos* são nomes genéricos que incluem tanto os prefixos "ribo-" quanto os "desoxirribo-". Observe que, aqui, os ribonucleosídeos e os ribonucleotídeos são simplesmente designados como nucleosídeos e nucleotídeos (por exemplo, riboadenosina como adenosina) e os desoxirribonucleosídeos e desoxirribonucleotídeos como desoxinucleosídeos e desoxinucleotídeos (por exemplo, desoxirriboadenosina como desoxiadenosina). Ambas as formas de nomear são aceitáveis, mas os nomes mais curtos são mais comumente usados. Timina é uma exceção; o nome de ribotimidina é usado para descrever sua ocorrência não usual no RNA.

Os ácidos nucléicos possuem duas espécies de pentoses. As unidades recorrentes desoxirribonucleotídicas do DNA possuem a 2′-desoxi-D-ribose e as unidades ribonucleotídicas do RNA contêm D-ribose. Nos nucleotídeos ambos os tipos de pentoses estão na sua forma β-furanosídica (anel fechado com cinco átomos). Como mostra a Figura 10-3, o anel da pentose não é planar mas ocorre em uma de uma variedade de conformações geralmente descritas como "pregueadas".

A Figura 10-4 mostra as estruturas e os nomes dos quatro principais **desoxirribonucleotídeos** (desoxirribonucleosídeos 5′-monofosfato), as unidades estruturais dos DNAs e os quatro principais **ribonucleotídeos** (ribonucleosídeos 5′-monofosfato), as unidades estruturais dos RNAs. Seqüências específicas longas dos nucleotídeos A, T, G e C no DNA são o repositário da informação genética.

Embora os nucleotídeos contendo as principais purinas e pirimidinas sejam os mais comuns, tanto o DNA quanto o RNA possuem também algumas bases minoritárias (Fig. 10-5). No DNA a mais comum destas são formas metiladas das bases principais, mas em alguns DNAs virais certas bases podem ser hidroximetiladas ou glicosiladas. Bases alteradas ou não usuais nas moléculas de DNA freqüentemente possuem papéis na regulação ou proteção da informação genética. Bases minoritárias de muitos tipos são também encontradas nos RNAs, especialmente no tRNA (veja Fig. 26-26).

A nomenclatura para as bases minoritárias pode ser confusa. Como as bases principais, muitas possuem nomes comuns — como a hipoxantina, por exemplo, mostrada como seu nucleosídeo inosina na Figura 10-5. Quando um átomo no anel purínico ou pirimidínico é substituído, a convenção usual (usada aqui) é simplesmente indicar a posição da substituição no anel pelo seu número — por exemplo, 5-metilcitosina, 7-metilguanina e 5-hidroximetilcitosina (mostradas como nucleosídeos na Fig. 10-5). O elemento ao qual o substituinte é ligado (N, C etc.) não é identificado. A convenção muda quando o átomo substituído é exocíclico (não dentro da estrutura do anel), nesse caso o tipo de átomo é identificado e a posição do anel ao qual ele está ligado é anotada com o número sobrescrito. O grupo amino ligado ao C-6 na adenina torna-se N^6; semelhantemente, o oxigênio da carbonila e o grupo amino em C-6 e C-2 da guanina tornam-se O^6 e N^2, respectivamente. Exemplos dessa nomenclatura são a N^6-metiladenosina e a N^2-metilguanosina (Fig. 10-5).

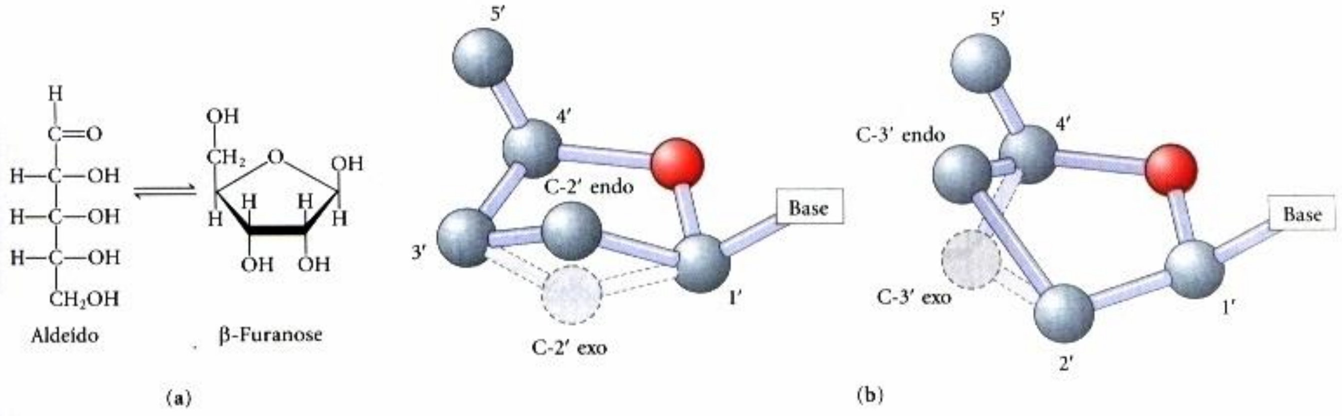
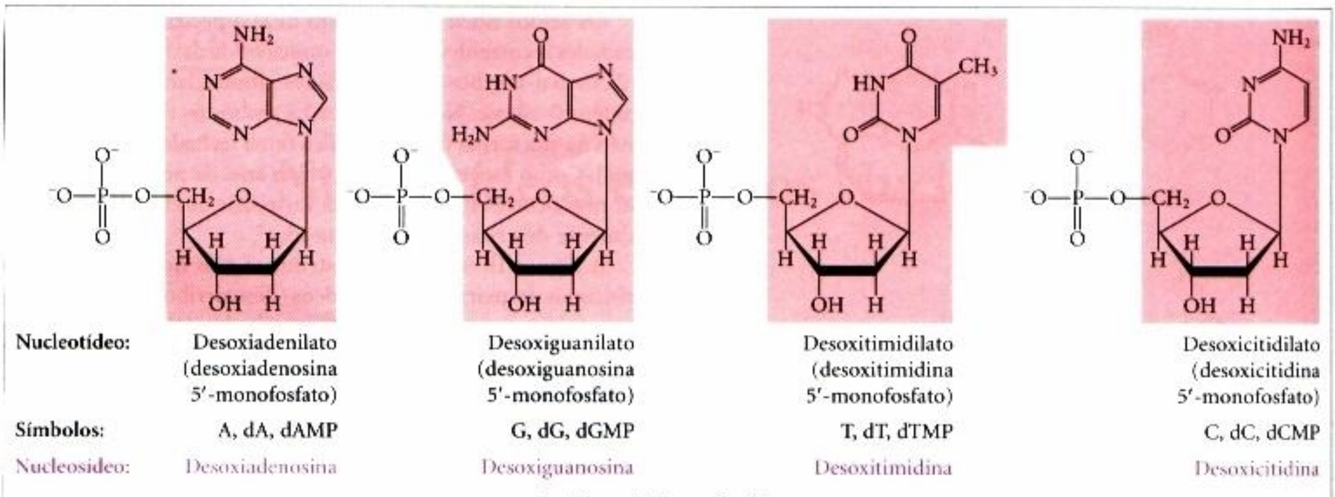
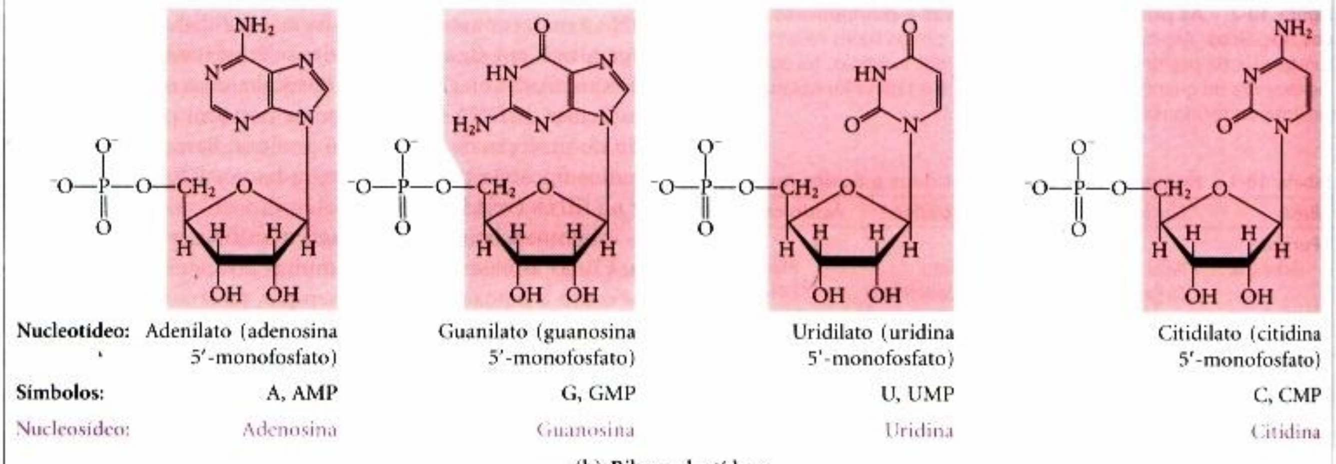


Figura 10-3 – Conformações da ribose. (**a**) Em solução, as formas em cadeia aberta (aldeídica) e em anel (β-furanosídica) da ribose livre estão em equilíbrio. O RNA contém apenas a forma em anel, β-D-ribofuranose. A desoxirribose sofre uma interconversão semelhante em solução, mas no DNA existe apenas como β-2′-desoxi-D-ribofuranose. (**b**) Os anéis ribofuranose nos nucleotídeos podem existir em quatro conformações pregueadas diferentes. Em todos os casos, quatro dos cinco átomos estão em um plano único. O quinto átomo (C-2′ ou C-3′) está ou no mesmo lado (endo) ou no lado oposto (exo) ao plano relativo ao átomo C-5′.


NH₂
O
CH₃
O⁻
⁻O—P—O—CH₂
OH H
Nucleotídeo:
Desoxiadenilato (desoxiadenosina 5'-monofosfato)
Desoxiguanilato (desoxiguanosina 5'-monofosfato)
Desoxitimidilato (desoxitimidina 5'-monofosfato)
Desoxicitidilato (desoxicitidina 5'-monofosfato)
Símbolos:
A, dA, dAMP
G, dG, dGMP
T, dT, dTMP
C, dC, dCMP
Nucleosídeo:
Desoxiadenosina
Desoxiguanosina
Desoxitimidina
Desoxicitidina

(a) **Desoxirribonucleotídeos**


NH₂
O
O⁻
⁻O—P—O—CH₂
OH OH
Nucleotídeo:
Adenilato (adenosina 5'-monofosfato)
Guanilato (guanosina 5'-monofosfato)
Uridilato (uridina 5'-monofosfato)
Citidilato (citidina 5'-monofosfato)
Símbolos:
A, AMP
G, GMP
U, UMP
C, CMP
Nucleosídeo:
Adenosina
Guanosina
Uridina
Citidina

(b) **Ribonucleotídeos**

Figura 10-4 – Desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos dos ácidos nucléicos. Todos os nucleotídeos são mostrados na sua forma livre em pH 7,0. As unidades nucleotídicas do DNA (**a**) são usualmente simbolizadas como A, G, T e C e algumas vezes como dA, dG, dT e dC, e as do RNA (**b**), como A, G, U e C. Na sua forma livre, estes desoxirribonucleotídeos são comumente abreviados como dAMP, dGMP, dTMP e dCMP; os ribonucleotídeos como AMP, GMP, UMP e CMP. Para cada nucleotídeo, o nome mais comum é seguido pelo nome completo entre parênteses. Todas as abreviações assumem que o grupo fosfato está na posição 5'. A porção nucleosídica de cada molécula está sombreada em vermelho. Nesta e nas ilustrações seguintes, os carbonos do anel não são mostrados.

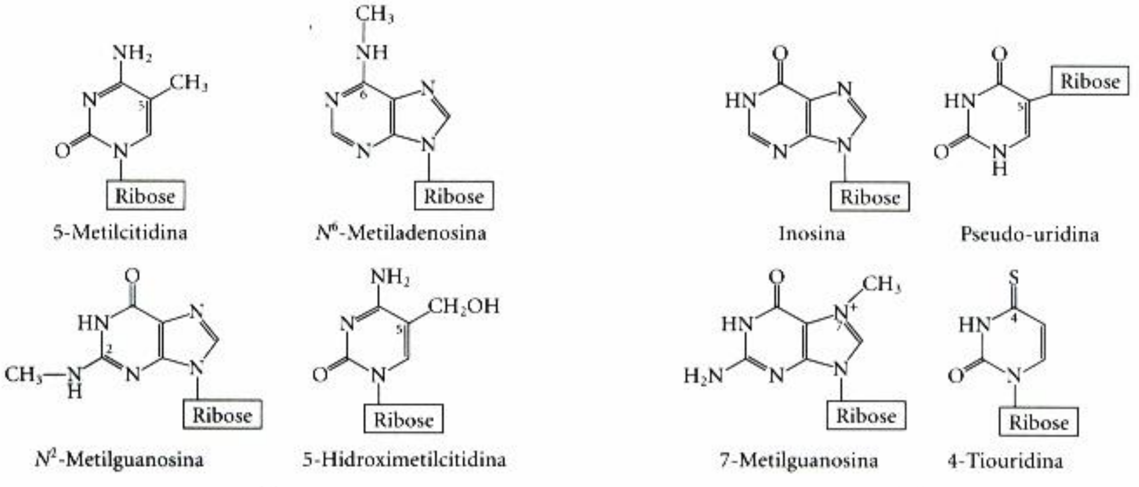
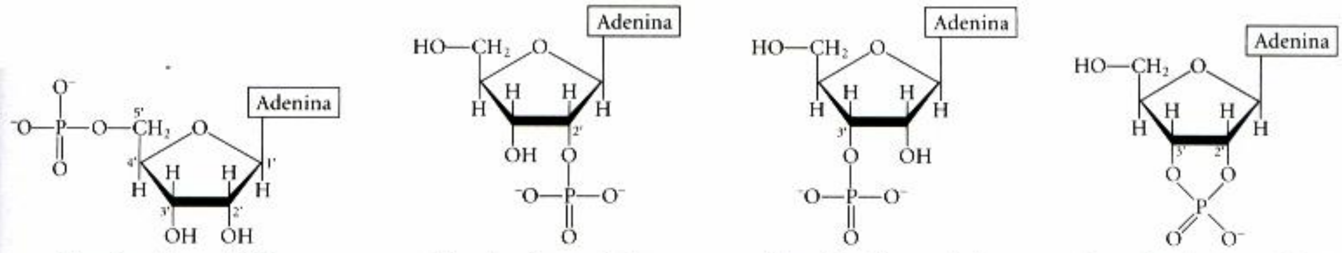

5-Metilcitidina
N^6-Metiladenosina
Inosina
Pseudo-uridina
N^2-Metilguanosina
5-Hidroximetilcitidina
7-Metilguanosina
4-Tiouridina
Ribose
NH₂
CH₃
NH
CH₂OH
S
(a)
(b)

Figura 10-5 – Algumas bases purínicas e pirimidínicas minoritárias, mostradas como nucleosídeos. (**a**) Bases minoritárias do DNA. A 5-metilcitidina ocorre no DNA de animais e plantas superiores, a N^6-metiladenosina no DNA bacteriano e a 5-hidroximetilcitidina no DNA de bactérias infectadas com certos bacteriófagos. (**b**) Algumas bases minoritárias dos tRNAs. A inosina contém a base hipoxantina. Observe que a pseudo-uridina, como a uridina, contém uracila; elas se distinguem no ponto de ligação à ribose — na uridina, a uracila é ligada por meio do N-1, o ponto normal da ligação para as pirimidinas, na pseudo-uridina, é por meio do C-5.



Adenosina 5'-monofosfato Adenosina 2'-monofosfato Adenosina 3'-monofosfato Adenosina 2',3'-monofosfato cíclico

Figura 10-6 – Alguns monofosfatos da adenosina. As adenosinas 2'-monofosfato, 3'-monofosfato e 2',3'-monofosfato cíclico são formadas pela hidrólise enzimática e alcalina do RNA.

As células contêm nucleotídeos com grupos fosfato em posições outras que a do carbono-5' (Fig. 10-6). **Ribonucleosídeos 2',3'-monofosfato cíclicos** são intermediários isoláveis e os **ribonucleosídeos 3'-monofosfato** são produtos finais da hidrólise do RNA por certas ribonucleases. Outras variações são a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e a guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), consideradas no final deste capítulo.

As ligações fosfodiésteres unem os nucleotídeos sucessivos aos ácidos nucléicos

Os nucleotídeos sucessivos, tanto no DNA quanto no RNA, são ligados covalentemente por meio de "pontes" de grupos fosfato, em que o grupo 5'-hidroxila de uma unidade nucleotídica une-se ao grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo seguinte por uma **ligação fosfodiéster** (Fig. 10-7). Dessa forma, os esqueletos covalentes dos ácidos nucléicos consistem de resíduos fosfato e pentose alternantes e as bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais unidos ao esqueleto a intervalos regulares. Os esqueletos, tanto do DNA quanto do RNA, são hidrofílicos. Os grupos hidroxila dos resíduos de açúcar formam pontes de hidrogênio com a água. Os grupos fosfato, com um pK_a próximo de 0, estão completamente ionizados e carregados negativamente em pH 7,0, e as cargas negativas estão geralmente neutralizadas por interações iônicas com cargas positivas nas proteínas, íons metálicos e poliaminas.

Todas as ligações fosfodiésteres possuem a mesma orientação ao longo da cadeia (Fig. 10-7), conferindo a cada fita linear do ácido nucléico uma polaridade específica e distinta nas extremidades 5' e 3'. Por definição, a **extremidade 5'** não possui um nucleotídeo na posição 5', e a **extremidade 3'** não o possui na posição 3' (Fig. 10-7). Outros grupos (na maioria das vezes um ou mais fosfatos) podem estar presentes em uma ou em ambas as extremidades.

O esqueleto covalente do DNA e RNA está sujeito a hidrólise lenta, não-enzimática, da ligação fosfodiéster. No tubo de ensaio, o RNA é hidrolisado rapidamente quando em condições alcalinas, mas o DNA não; os grupos 2'-hidroxila no RNA (ausentes no DNA) estão diretamente envolvidos no processo. Os 2',3'-monofosfatos cíclicos são os primeiros produtos da ação alcalina no RNA e são hidrolisados rapidamente, produzindo, em seguida, uma mistura de nucleosídeos 2' e 3'-monofosfatos (Fig. 10-8).

As seqüências nucleotídicas dos ácidos nucléicos podem ser representadas esquematicamente, como ilustrado a seguir, por um segmento de DNA contendo cinco unidades nucleotídicas. Os grupos fosfato estão simbolizados por Ⓟ e cada desoxirribose por uma linha vertical, do C-1', no topo, até o C-5' na base (mas tenha em mente que o açúcar está sempre na forma de anel fechado β-furanosídica nos ácidos nucléicos). As linhas que li-

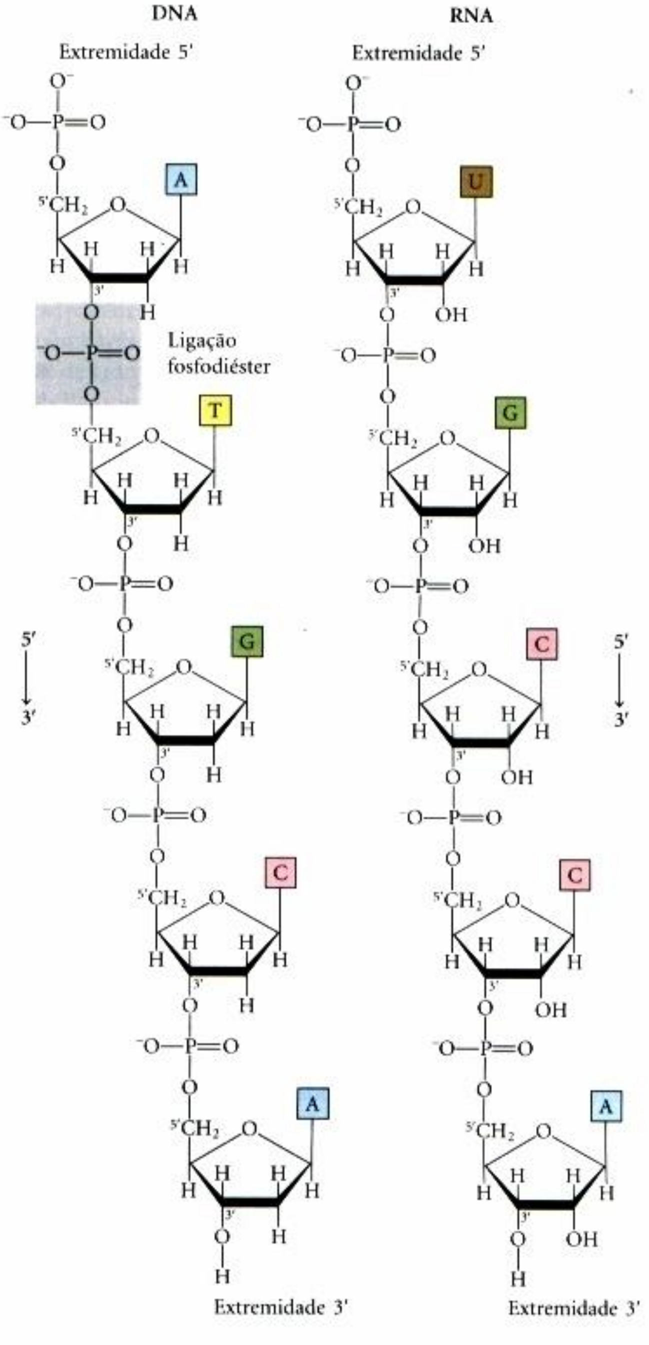


Figura 10-7 – Ligações fosfodiésteres no esqueleto covalente do DNA e RNA. As ligações fosfodiésteres (uma das quais está sombreada em cinza no DNA) unem unidades nucleotídicas sucessivas. O esqueleto de grupos fosfato e pentose alternantes em ambos os tipos de ácidos nucléicos é altamente polar. A extremidade 5' da macromolécula não possui um nucleotídeo na posição 5', e a extremidade 3' não o possui na posição 3'.

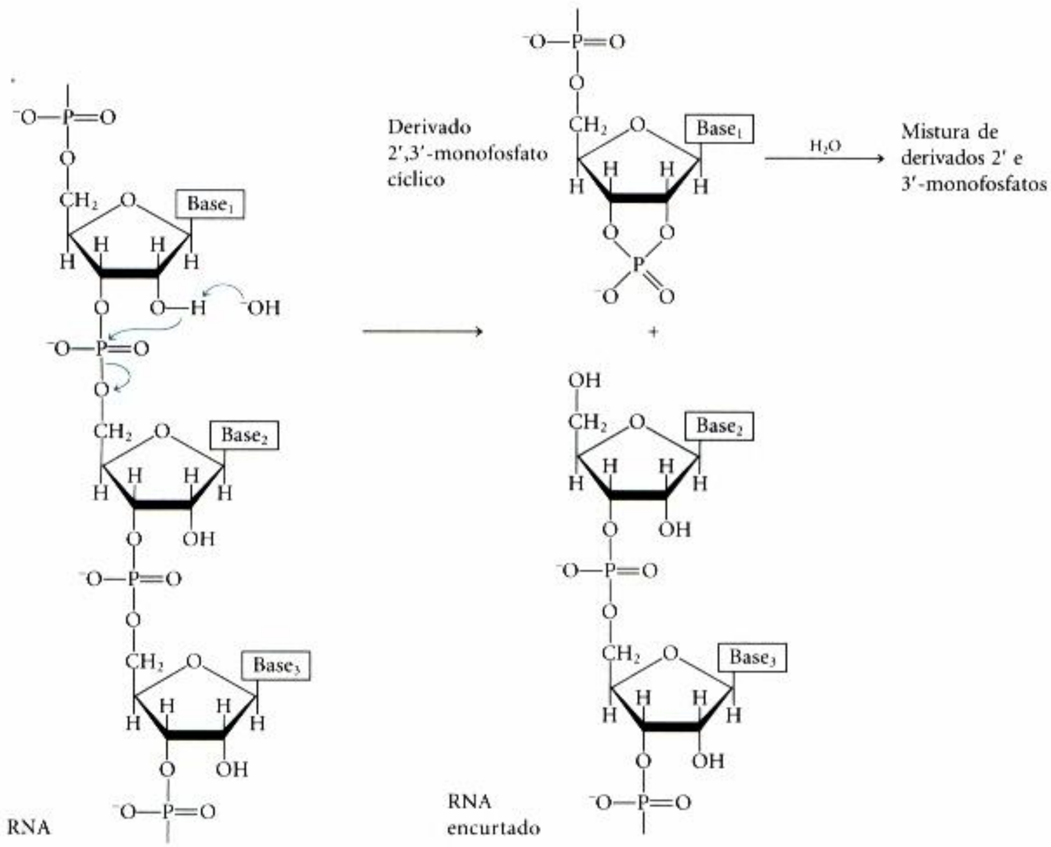
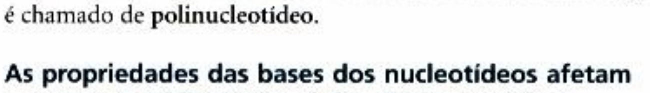

Derivado 2',3'-monofosfato cíclico
H_2O
Mistura de derivados 2' e 3'-monofosfatos
Base₁
Base₂
Base₃
RNA
RNA encurtado

Figura 10-8 – Hidrólise do RNA em condições alcalinas. A 2'-hidroxila atua como um nucleófilo em um deslocamento intramolecular. O derivado cíclico 2',3'-monofosfato é hidrolisado até uma mistura de 2' e 3'-monofosfatos. O DNA, que não possui as 2'-hidroxilas, permanece estável em condições semelhantes.

gam os nucleotídeos (através de Ⓟ) são desenhadas diagonalmente a partir do meio (C-3') da desoxirribose de um nucleotídeo até a base (C-5') do seguinte. Por convenção, a estrutura de uma fita simples do ácido nucléico é sempre escrita com a extremidade 5' na esquerda e a extremidade 3' na direita, isto é, na direção 5'→3'. Algumas representações mais simples desse pentadesoxirribonucleotídeo são pA-C-G-T-A_{OH}, pApCpGpTpA e pACGTA.



Um ácido nucléico pequeno é referido como um **oligonucleotídeo.** A definição de "pequeno" é algo arbitrária, entretanto polímeros contendo 50 nucleotídeos ou menos são geralmente chamados de **oligonucleotídeos.** Um ácido nucléico mais longo é chamado de **polinucleotídeo.**

As propriedades das bases dos nucleotídeos afetam a estrutura tridimensional dos ácidos nucléicos

Purinas e pirimidinas livres são compostos fracamente básicos e, dessa forma, são chamados de bases. Elas possuem uma variedade de propriedades químicas que afetam a estrutura e, finalmente, a função dos ácidos nucléicos. As purinas e as pirimidinas usuais no DNA e RNA são moléculas altamente conjugadas (veja Fig. 10-2), uma propriedade com importantes conseqüências para a estrutura, a distribuição eletrônica e a absorção da luz dos ácidos nucléicos. A ressonância envolvendo muitos átomos no anel confere à maioria das ligações um caráter parcial de dupla ligação. Um resultado é que as pirimidinas são moléculas planas e as purinas quase planas, com uma leve ruga. As bases purínicas e pirimidínicas livres podem existir em duas ou mais formas tautoméricas dependendo do pH. A uracila, por exemplo, ocorre nas formas lactâmica, lactímica e lactâmica dupla (Fig. 10-9). As estruturas mostradas na Figura 10-2 são os tautômeros predominantes em pH 7,0. Como resultado da ressonância, todas as bases absorvem luz UV e os ácidos nucléicos são caracterizados por uma forte absorção em comprimentos de onda próximos aos 260nm (Fig. 10-10).

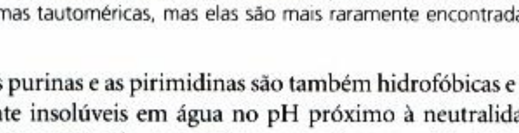
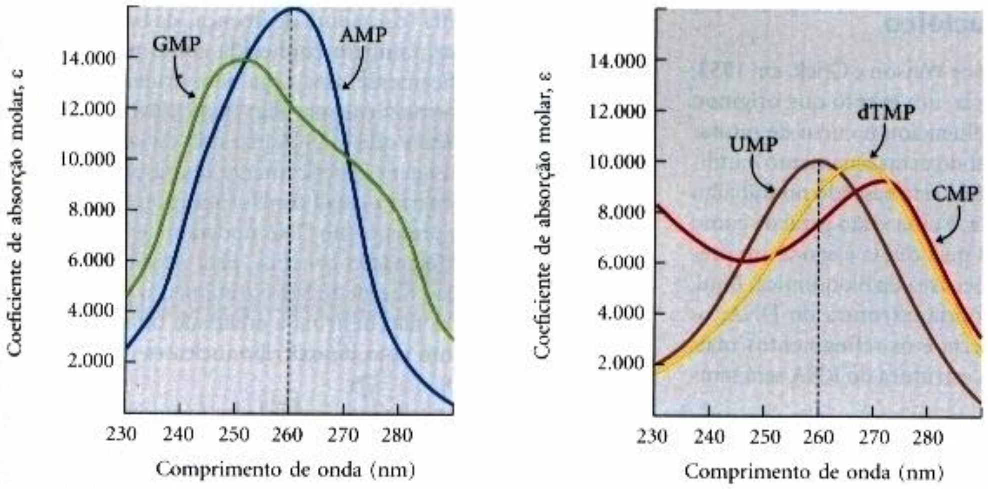


Figura 10-9 – Formas tautoméricas da uracila. Em pH 7,0 predomina a forma lactâmica; as outras formas tornam-se mais proeminentes à medida que o pH diminui. As outras pirimidinas e purinas livres também possuem formas tautoméricas, mas elas são mais raramente encontradas.

As purinas e as pirimidinas são também hidrofóbicas e relativamente insolúveis em água no pH próximo à neutralidade da célula. Em pH ácido ou alcalino, as purinas e as pirimidinas tornam-se carregadas e sua solubilidade na água aumenta. Interações hidrofóbicas de empilhamento, em que duas ou mais bases são posicionadas com os planos de seus anéis em paralelo (seme-



Coeficientes de absorção molar em 260nm, ε_{260} ($M^{-1}cm^{-1}$)	
AMP	15.400
GMP	11.700
CMP	7.500
UMP	9.900
dTMP	9.200

Figura 10-10 – O espectro de absorção dos nucleotídeos comuns. Os espectros são mostrados como a variação do coeficiente de absorção molar em relação ao comprimento de onda. Os coeficientes de absorção molar em 260nm e pH 7,0 (ε_{260}) estão listados na tabela à direita. O espectro dos ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos correspondentes, bem como dos nucleosídeos, são essencialmente idênticos. Para misturas de nucleotídeos, um comprimento de onda em 260nm (linhas verticais tracejadas) é usado para as medições de absorção.

lhantemente ao empilhamento de moedas), representam uma de duas maneiras importantes de interação entre bases nos ácidos nucléicos. O empilhamento envolve uma combinação de interações van der Waals e dipolo-dipolo entre as bases. As interações de empilhamento das bases ajudam a minimizar o contato com a água e são muito importantes na estabilização da estrutura tridimensional dos ácidos nucléicos, como será descrito posteriormente.

Os grupos funcionais mais importantes das pirimidinas e purinas são os nitrogênios do anel, os grupos carbonila e os grupos aminoexocíclicos. Pontes de hidrogênio envolvendo os grupos amino e carbonila são o segundo modo de interação mais importante entre as bases. As pontes de hidrogênio entre as bases permitem uma associação complementar de duas (e ocasionalmente três ou quatro) fitas de ácido nucléico. Os padrões de ponte de hidrogênio mais importantes são aqueles definidos por James Watson e Francis Crick, em 1953, em que A se liga especificamente a T (ou U) e G se liga a C (Fig. 10-11). Esses dois tipos de **pares de bases** predominam nas fitas duplas de DNA e RNA, e os tautômeros mostrados na Figura 10-2 são os responsáveis por esses padrões. É esse pareamento específico de bases que permite a duplicação da informação genética, como discutiremos depois neste capítulo.

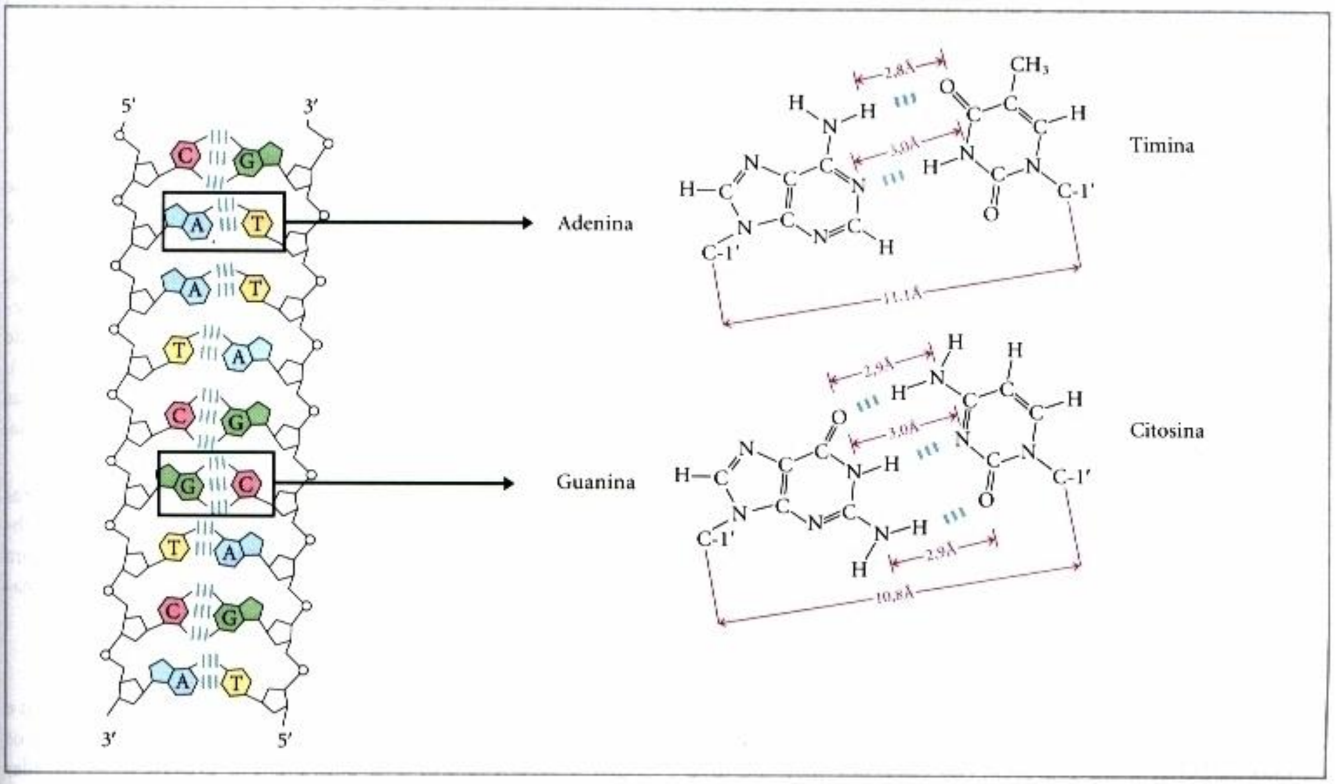


Figura 10-11 – Padrões das pontes de hidrogênio nos pares de bases definidos por Watson e Crick. Aqui, como em outras figuras deste livro, as pontes de hidrogênio são representadas por conjuntos de linhas azuis.

A Estrutura do Ácido Nucléico

A descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick, em 1953, foi um evento momentoso na ciência, um evento que originou disciplinas inteiramente novas e influenciou o curso de muitas outras. O nosso conhecimento atual do armazenamento e utilização da informação genética da célula está baseado no trabalho tornado possível por essa descoberta, e uma visão geral de como a informação genética é processada pela célula é agora um pré-requisito para a discussão de qualquer área da bioquímica. Aqui, nós nos preocuparemos com a própria estrutura do DNA, os eventos que levaram à sua descoberta e os refinamentos mais recentes em nosso conhecimento. A estrutura do RNA será também apresentada.

James Watson

Francis Crick

Como no caso da estrutura das proteínas (Capítulo 6), é algumas vezes útil descrever a estrutura dos ácidos nucléicos em termos dos níveis de complexidade hierárquica (primário, secundário e terciário). A estrutura primária de um ácido nucléico é a sua estrutura covalente e a seqüência de nucleotídeos. Qualquer estrutura regular, estável, adotada por alguns ou todos os nucleotídeos de um ácido nucléico pode ser referida como estrutura secundária. Todas as estruturas consideradas nas páginas seguintes deste capítulo situam-se na categoria de estrutura secundária. O enovelamento complexo dos cromossomos grandes dentro da cromatina eucariótica é geralmente considerado estrutura terciária, que será detalhada no Capítulo 24.

O DNA armazena a informação genética

A investigação bioquímica do DNA começou com Friedrich Miescher, que realizou os primeiros estudos químicos sistemáticos do núcleo da célula. Em 1868, Miescher isolou uma substância contendo fósforo, que chamou de "nucleína", de células do pus (leucócitos) obtidas de bandagens cirúrgicas descartáveis. Ele descobriu que a nucleína consistia de uma porção acídica, que hoje conhecemos como DNA, e de uma porção básica, protéica. Miescher descobriu depois uma substância acídica semelhante, na cabeça dos espermatozóides do salmão. Embora ele tenha purificado parcialmente o ácido nucléico e estudado suas propriedades, a estrutura covalente (primária) do DNA (como mostrado na Fig. 10-7) não se tornou conhecida com certeza senão no final da década de 1940.

Miescher e muitos outros suspeitavam que a nucleína (ácido nucléico) era associada de alguma forma com a herança celular, mas a primeira evidência direta de que o DNA é o possuidor da informação genética apareceu, em 1944, por meio de uma descoberta feita por Oswald T. Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty. Esses pesquisadores descobriram que o DNA extraído de uma cepa virulenta (causadora de doença) da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, também conhecida como pneumococo, transformava geneticamente uma cepa não-virulenta desse organismo em uma forma virulenta (Fig. 10-12). Avery e seus colaboradores concluíram que o DNA extraído da cepa virulenta transportava a mensagem geneticamente herdável da virulência. Nem todos aceitaram essas conclusões, porque traços de impurezas protéicas presentes no DNA poderiam ter sido o transportador real da informação genética. Essa possibilidade logo foi eliminada pela descoberta de que o tratamento do DNA com enzimas proteolíticas não destruía a atividade transformadora, mas sim o tratamento com desoxirribonucleases (enzimas que hidrolisam o DNA).

Um segundo experimento importante forneceu a evidência independente de que o DNA transportava a informação genética. Em 1952, Alfred D. Hershey e Martha Chase usaram o rastreamento com o fósforo radioativo (^{32}P) e o enxofre radioativo (^{35}S) para mostrar que, quando o vírus bacteriano (bacteriófago T2) infecta sua célula hospedeira, a *Escherichia coli*, é o fósforo contido no DNA da partícula viral, e não o enxofre contido na proteína da capa viral, que entra na célula hospedeira e fornece a informação genética para a replicação viral (Fig. 10-13).

Esses importantes experimentos iniciais e muitas outras linhas de evidência mostraram que o DNA é definitivamente o componente cromossômico que possui a informação genética das células vivas.

As moléculas de DNA possuem composições de base distintas

A pista mais importante para desvendar a estrutura do DNA veio do trabalho de Erwin Chargaff e seus colaboradores nos últimos anos da década de 1940. Eles descobriram que as quatro bases nucleotídicas do DNA ocorrem em proporções variadas nos diferentes organismos e que as quantidades de certas bases estão aproximadamente relacionadas. Esses dados, coletados de DNAs de um grande número de espécies, levaram Chargaff às seguintes conclusões:

1. A composição de bases do DNA geralmente varia de uma espécie para outra.
2. Espécimes de DNA isolados de diferentes tecidos da mesma espécie possuem a mesma composição de bases.
3. A composição de bases do DNA em uma dada espécie não se altera com a idade do organismo, o estado nutricional ou a modificação ambiental.
4. Em *todos* os DNAs celulares, independentemente da espécie, o número de resíduos de adenosina é igual ao número de resíduos de timidina (ou seja, A = T) e o número de resíduos de guanosina é igual ao número de resíduos de citidina (G = C). A partir dessas relações segue-se que a soma dos resíduos das purinas iguala-se à soma dos resíduos de pirimidina, ou seja, A + G = T + C.

Essas relações quantitativas, algumas vezes chamadas de "regras de Chargaff", foram confirmadas por muitos pesquisadores subseqüentes. Elas foram a chave para o estabelecimento da estrutura tridimensional do DNA e forneceram dicas de como a informação genética é codificada e passa de uma geração para a outra.

O DNA é uma dupla hélice

Para lançar mais luz na estrutura do DNA, Rosalind Franklin e Maurice Wilkins usaram o poderoso método da difração dos raios X (veja Adendo 6-3) para analisar cristais de DNA. Eles mostraram, no início da década de 1950, que o DNA produzia um padrão de difração de raios X característico (Fig. 10-14).

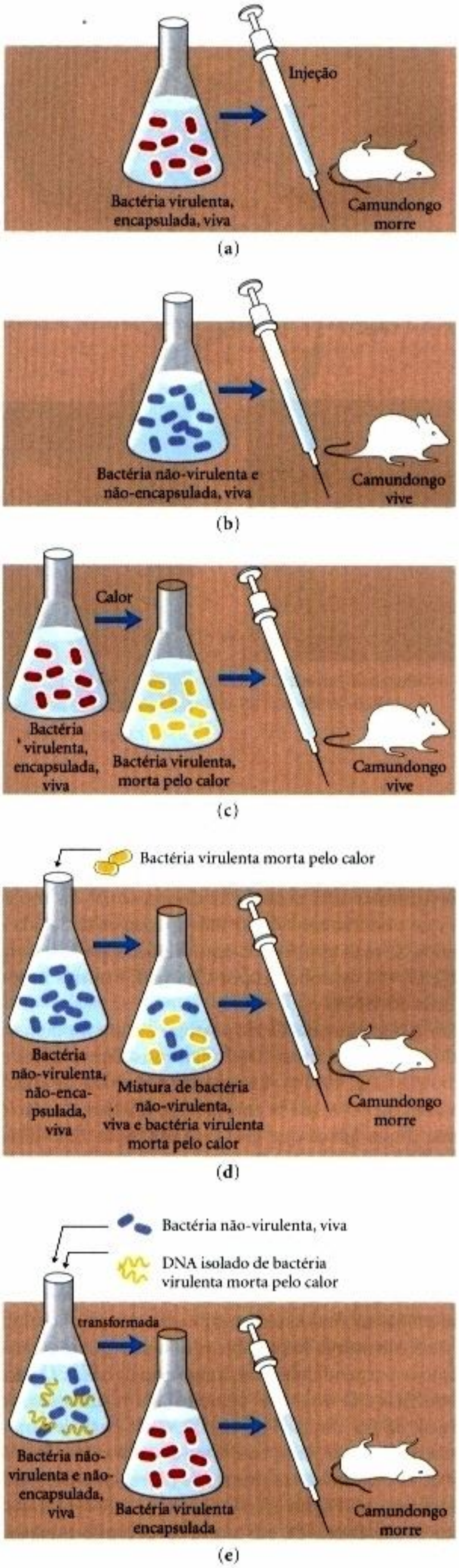

Injeção
Bactéria virulenta, encapsulada, viva
Camundongo morre
(a)
Bactéria não-virulenta e não-encapsulada, viva
Camundongo vive
(b)
Calor
Bactéria virulenta, encapsulada, viva
Bactéria virulenta, morta pelo calor
Camundongo vive
(c)
Bactéria virulenta morta pelo calor
Bactéria não-virulenta, não-encapsulada, viva
Mistura de bactéria não-virulenta, viva e bactéria virulenta morta pelo calor
Camundongo morre
(d)
Bactéria não-virulenta, viva
DNA isolado de bactéria virulenta morta pelo calor
transformada
Bactéria não-virulenta e não-encapsulada, viva
Bactéria virulenta encapsulada
Camundongo morre
(e)

Figura 10-12 – O experimento Avery-MacLeod-McCarty. Quando injetada em camundongos, a cepa encapsulada do pneumococo (**a**) é letal, enquanto a cepa não-encapsulada (**b**) é inócua, como o é a cepa encapsulada morta pelo calor (**c**). Pesquisa anterior do bacteriologista Frederick Griffith tinha mostrado que a adição de bactérias virulentas mortas pelo calor (que isoladamente são inócuas para o camundongo) a uma cepa não-virulenta transformava esta permanentemente em uma bactéria encapsulada, virulenta e letal (**d**). Ele concluiu que um fator de transformação da bactéria virulenta morta pelo calor tinha entrado na bactéria não-virulenta viva, tornado-a virulenta e encapsulada.

Avery e seus colaboradores identificaram o fator de transformação de Griffith como DNA. Eles extraíram o DNA de pneumococos virulentos mortos pelo calor, removendo as proteínas tão completamente quanto possível, e adicionaram esse DNA a bactérias não-virulentas (**e**). Os pneumococos não-virulentos foram permanentemente transformados em cepa virulenta. O DNA evidentemente entrou na bactéria não-virulenta e os genes para a virulência e para a formação da cápsula tornaram-se incorporados no cromossomo das bactérias não-virulentas. Todas as gerações subseqüentes dessas bactérias foram, portanto, virulentas e encapsuladas.

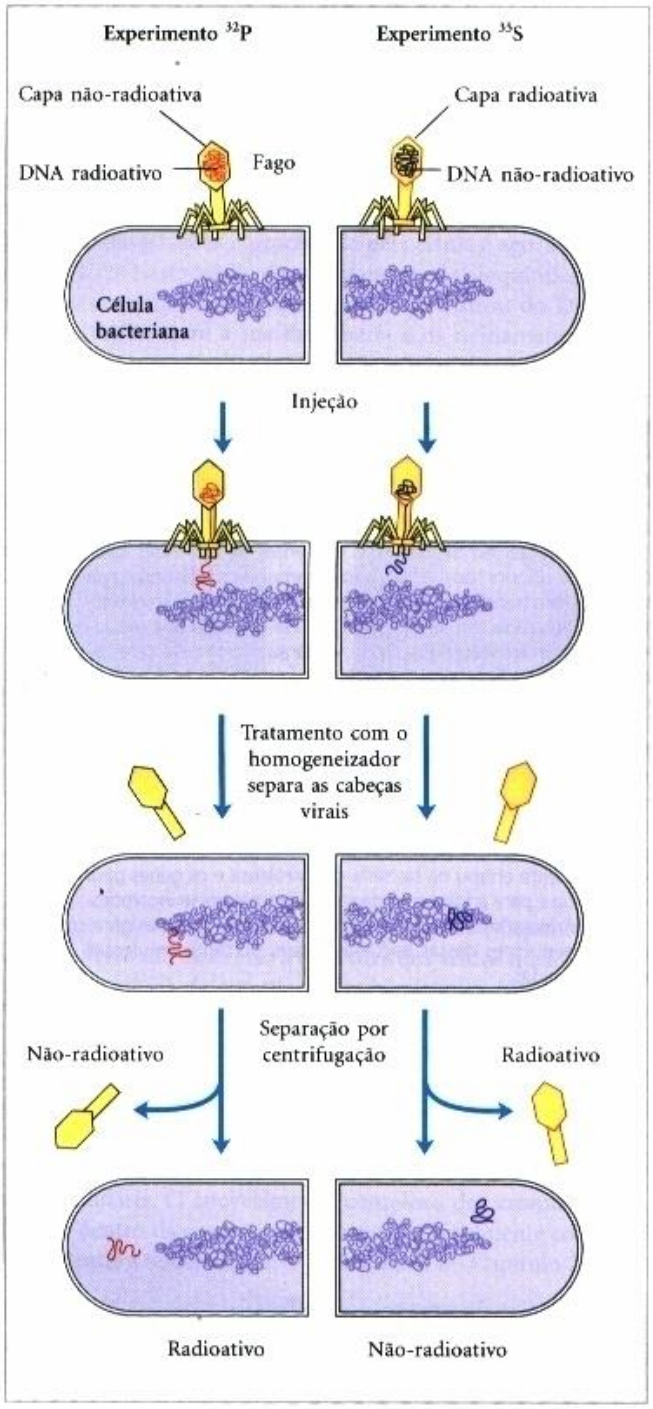


Figura 10-13 – O experimento de Hershey-Chase. Duas preparações de partículas de bacteriófagos T2 isotopicamente marcadas foram preparadas. Uma foi marcada com ^{32}P nos grupos fosfato do DNA e a outra com ^{35}S nos aminoácidos contendo enxofre das proteínas da capa (capsídeos). (Observe que o DNA não contém enxofre e as proteínas virais não possuem fósforo.) Permitiu-se, então, que as duas preparações de fagos marcados infectassem as suspensões de bactéria não-marcadas. Cada suspensão de células infectadas com fagos foi agitada num homogeneizador para afastar os capsídeos virais das bactérias. As bactérias e as capas virais vazias (chamadas de fantasmas) foram então separadas por centrifugação. As células infectadas com o fago marcado com ^{32}P continham-no no seu interior, indicando que o DNA viral marcado havia entrado nas células, e os fantasmas virais não continham a radioatividade. As células infectadas com o fago marcado com ^{35}S não tinham nenhuma radioatividade após o tratamento com o homogeneizador, mas os fantasmas virais continham ^{35}S. Partículas virais descendentes (não mostradas) foram produzidas em ambas as preparações das bactérias, algum tempo depois de as capas virais terem sido removidas, indicando que a mensagem genética para a sua replicação havia sido introduzida pelo DNA viral, e não pela proteína viral.

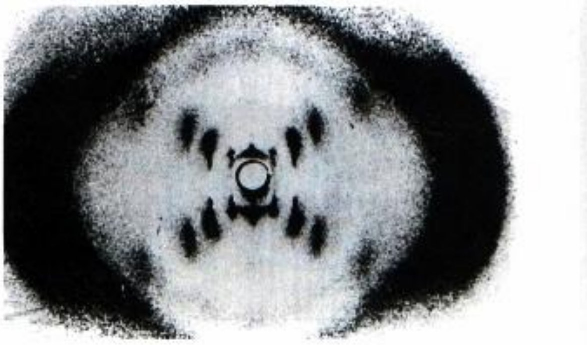


Figura 10-14 – Padrão de difração dos raios X do DNA. As manchas formando uma cruz no centro denotam uma estrutura helicoidal. As bandas fortes à esquerda e à direita originam-se de bases recorrentes.

Rosalind Franklin
(1920-1958)

Maurice Wilkins

A partir desse padrão deduziram que os polímeros DNA são helicoidais com duas periodicidades ao longo do seu eixo maior, uma primeira de 3,4Å e uma segunda de 34Å. O problema era então formular um modelo tridimensional da molécula do DNA que poderia considerar não apenas os dados da difração dos raios X, mas também as equivalências de bases específicas A = T e G = C, descobertas por Chargaff, e outras propriedades químicas do DNA.

Em 1953, Watson e Crick postularam um modelo tridimensional para a estrutura do DNA que considerava todos os dados disponíveis (Fig. 10-15). Esse modelo consiste de duas cadeias helicoidais de DNA que se enrolam em um mesmo eixo formando uma dupla hélice que gira no sentido da mão direita (veja Adendo 6-1 para uma explicação do sentido da mão direita ou esquerda em uma estrutura helicoidal). O esqueleto hidrofílico de grupos alternantes desoxirribose e fosfatos carregados negativamente estão na parte externa da dupla hélice, voltado para a água circundante. O anel furanosídico de cada desoxirribose está na conformação endo em C-2'. As bases purínicas e pirimidínicas de ambas as fitas estão empilhadas dentro da dupla hélice, com suas estruturas hidrofóbicas de anéis quase planos muito próximos e perpendiculares ao longo eixo da hélice. O pareamento das duas fitas cria um **sulco principal** e um **sulco secundário** na superfície da fita dupla (Fig. 10-15). Cada base de uma fita está pareada no mesmo plano com uma base da outra fita. Watson e Crick descobriram que as pontes de hidrogênio dos pares de bases, ilustradas na Figura 10-11, G com C e A com T, são as que melhor se encaixam na estrutura, fornecendo uma explicação para a regra de Chargaff que, em qualquer DNA, G = C e A = T. É importante observar que três pontes de hidrogênio podem se formar entre G e C, simbolizadas por G≡C, mas apenas duas

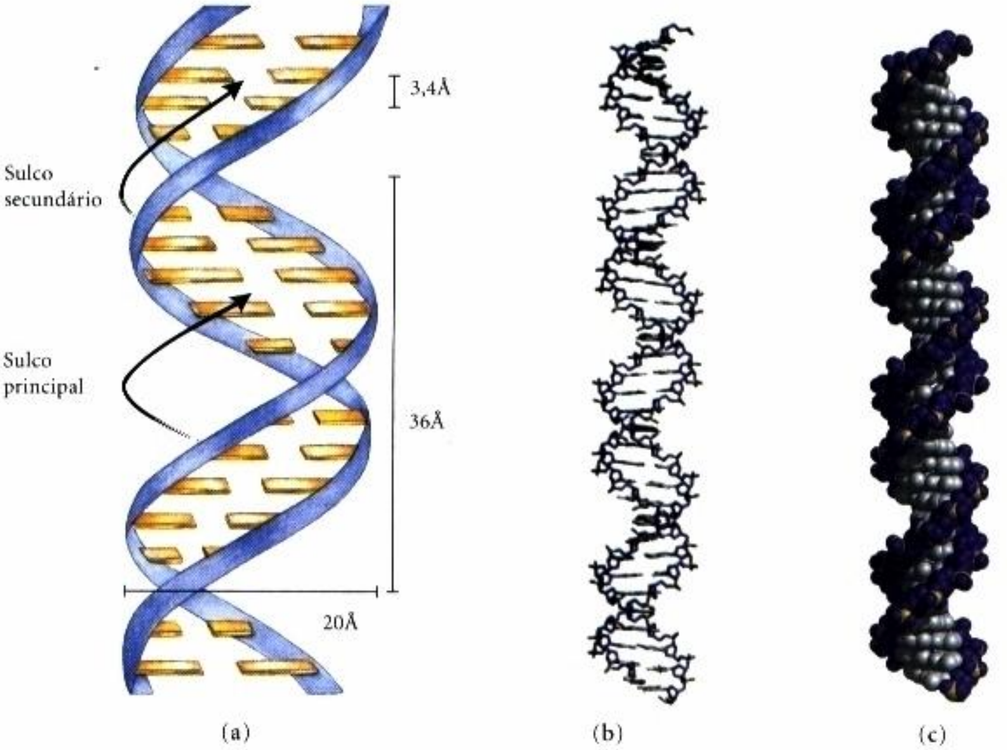


Figura 10-15 – O modelo Watson-Crick para a estrutura do DNA. O modelo original propunha que houvesse 10 pares de bases por volta da hélice de 34Å (3,4nm); medidas subseqüentes mostraram que há 10,5 pares de bases por volta de 36Å (3,6nm). (**a**) Representação esquemática mostrando as dimensões da hélice. (**b**) Representação linear mostrando o esqueleto e o empilhamento das bases. (**c**) Modelo espaço-cheio.

se formam entre A e T, simbolizadas por A═T. Essa é uma razão para a descoberta de que a separação das fitas pareadas do DNA é mais difícil quanto maior for o quociente entre as bases G≡C e A═T. Outros pareamentos de bases tendem (em grau variado) a desestabilizar a estrutura da dupla hélice.

Quando Watson e Crick construíram seu modelo, eles tiveram de decidir de início se as fitas do DNA deveriam ser **paralelas** ou **antiparalelas** — se suas ligações 5′,3′-fosfodiésteres deveriam correr na mesma direção ou em direções opostas. O antiparalelismo produziu o modelo mais convincente, e estudos posteriores com as DNA polimerases (Capítulo 25) forneceram a evidência experimental de que as fitas são na verdade antiparalelas, um achado finalmente confirmado pela análise de raios X.

Para explicar as periodicidades observadas no padrão da difração dos raios X das fibras de DNA, Watson e Crick usaram modelos moleculares para mostrar que as bases empilhadas verticalmente dentro da dupla hélice estariam separadas cerca de 3,4Å e que a repetição secundária de 34Å seria devido à presença de 10 resíduos de nucleotídeos em cada volta completa da dupla hélice. Em solução aquosa, a estrutura difere ligeiramente das estruturas das fibras, possuindo 10,5 pares de bases por volta da hélice (Fig. 10-15).

Como pode ser visto na Figura 10-16, as duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas da dupla hélice do DNA não são idênticas nem na composição nem na seqüência de bases. Na verdade elas são **complementares** entre si. Toda vez que aparecer adenina em uma cadeia, timina será encontrada na outra; similarmente, quando se encontrar guanina em uma cadeia, citosina será encontrada na outra.

A dupla hélice do DNA, ou dúplex, é mantida unida por duas forças, como descrito anteriormente: as pontes de hidrogênio entre os pares de bases complementares (Fig. 10-11) e as

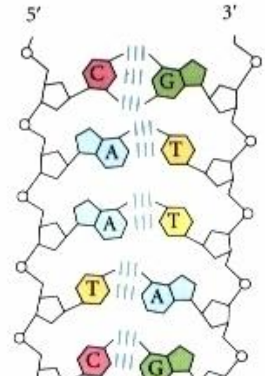


Figura 10-16 – Complementariedade das fitas na dupla hélice de DNA. As fitas antiparalelas complementares do DNA seguem as regras de paridade propostas por Watson e Crick. As fitas antiparalelas pareadas pelas bases diferem na composição das bases: a fita à esquerda possui a composição A_3 T_2 G_1 C_3; a fita à direita, A_2 T_3 G_3 C_1. Elas também diferem na seqüência quando cada cadeia for lida na direção 5′→3′. Observe as equivalências de bases: A = T e G = C na dúplex.

interações de empilhamento das bases. A complementaridade entre as fitas de DNA é atribuível às pontes de hidrogênio entre pares de bases. As interações de empilhamento das bases, que são em grande parte inespecíficas com respeito à identidade das bases empilhadas, dão a maior contribuição para a estabilidade da dupla hélice.

As características importantes do modelo de estrutura da dupla hélice do DNA são apoiadas por muita evidência química e biológica. Além disso, o modelo imediatamente sugere um mecanismo para a transmissão da informação genética. A característica essencial do modelo é a complementaridade das duas fitas do DNA. Como Watson e Crick foram capazes de observar, muito antes que os dados confirmatórios se tornassem disponíveis, essa estrutura poderia logicamente ser replicada pela (1) separação das duas fitas e (2) síntese de uma fita complementar para cada uma. Pelo fato de os nucleotídeos em cada nova fita estarem unidos em uma seqüência especificada pelas regras de pareamento de bases expressas anteriormente, cada fita preexistente poderia funcionar como um molde para guiar a síntese de uma fita complementar (Fig. 10-17). Essas expectativas foram confirmadas experimentalmente, inaugurando uma revolução em nossa compreensão da herança biológica.

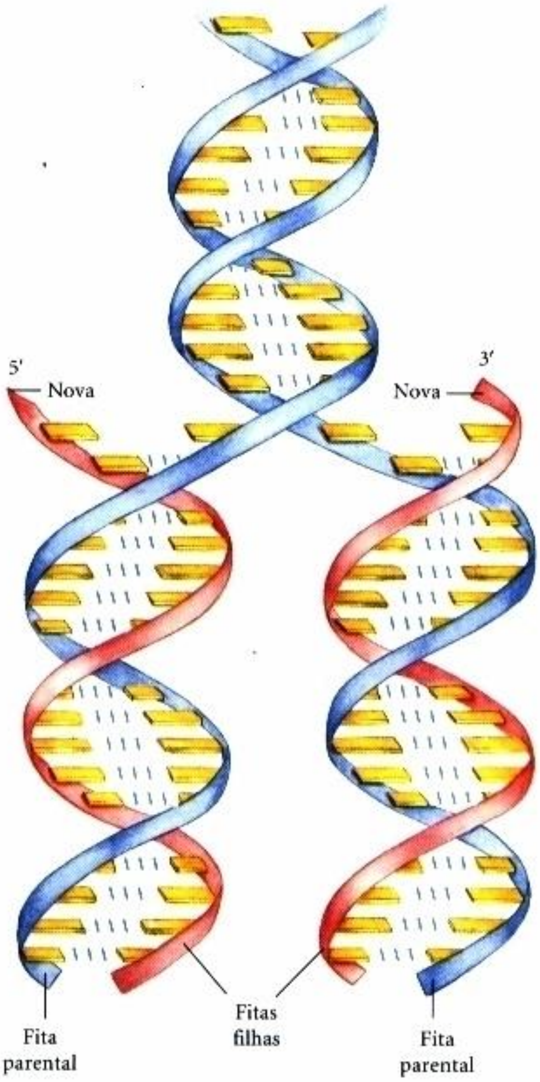


Figura 10-17 – Replicação do DNA como sugerida por Watson e Crick. As fitas preexistentes ou "parentais" tornam-se separadas e cada uma é o molde para a biossíntese de uma fita "filha" complementar (em vermelho).

O DNA pode ocorrer em formas tridimensionais diferentes

O DNA é uma molécula notavelmente flexível. É possível uma considerável rotação em volta de várias ligações no esqueleto açúcar-fosfato (fosfodesoxirribose), e a flutuação térmica pode produzir curvatura, esticamento e despareamento (fusão) das fitas. Muitos desvios significativos da estrutura Watson-Crick do DNA são encontrados no DNA celular, e alguns, ou todos eles, podem desempenhar papéis importantes no metabolismo do DNA. Essas variações estruturais geralmente não afetam as propriedades-chave do DNA definidas por Watson e Crick: complementaridade das fitas, fitas antiparalelas e requerimento de pares de bases A═T e G≡C.

A variação estrutural no DNA reflete três aspectos: as possíveis conformações diferentes do esqueleto da desoxirribose, a rotação sobre as ligações contíguas que compõem o esqueleto da fosfodesoxirribose (Fig. 10-18a) e a rotação livre sobre a ligação C-1′—*N*-glicosídica (Fig. 10-18b). Por causa de obstáculos estéricos, os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos são restritos a duas conformações estáveis com respeito à desoxirribose, chamadas de *sin* e *anti* (Fig. 10-18b). As pirimidinas são geralmente restritas à conformação anti por causa da interferência estérica entre o açúcar e o oxigênio da carbonila no C-2 da pirimidina.

A estrutura Watson-Crick é também referida como **forma B do DNA**, ou DNA B. A forma B é a estrutura mais estável para uma seqüência ao acaso da molécula do DNA em condições fisiológicas e, portanto, é o padrão de referência em qualquer estudo das propriedades do DNA. Duas variantes estruturais do DNA, que foram bem caracterizadas em estruturas de cristais, são as **formas A** e **Z**. Essas três conformações do DNA são mostradas na Figura 10-19, com um resumo das suas propriedades. A forma A é favorecida em muitas soluções que são relativamente desprovidas de água. O DNA ainda está arranjado em uma dupla hélice tendo o sentido da mão direita, mas a hélice é mais larga e o número de pares de bases por volta da hélice é 11, em vez de 10,5, encontrados na forma B do DNA. O plano dos pares de bases no DNA A é inclinado cerca de 20° em relação ao eixo da hélice. Essas alterações estruturais aprofundam o sulco principal enquanto tornam o sulco secundário mais raso. Os reagentes utilizados para promover a cristalização do DNA tendem a desidratá-lo, e dessa forma a maioria das moléculas de DNA curtas tende a se cristalizar na forma A.

A forma Z do DNA é um afastamento mais radical da estrutura B; a distinção mais óbvia é a rotação da hélice no sentido da mão esquerda. Há 12 pares de bases por volta da hélice, e a estrutura parece mais delgada e alongada. O esqueleto do DNA adquire a aparência de um ziguezague. Certas seqüências de nucleotídeos dobram-se em hélices Z, de sentido da mão esquerda, mais facilmente que outras. Exemplos proeminentes são as seqüências nas quais pirimidinas se alternam com purinas, especialmente alternando os resíduos C e G ou 5-metil-C e G. Para formar a hélice no sentido da mão esquerda no DNA Z, os resíduos de purinas movem-se para a conformação *sin*, alternando com as pirimidinas na conformação *anti*. O sulco principal está pobremente aparente no DNA Z, e o sulco secundário é estreito e fundo.

Se a ocorrência do DNA A em células é incerta, há evidência para alguns pedaços curtos (trechos) de DNA Z tanto em procariotos como em eucariotos. Esses trechos de DNA Z podem desempenhar um papel (ainda não definido) na regulação da expressão de alguns genes ou na recombinação genética.

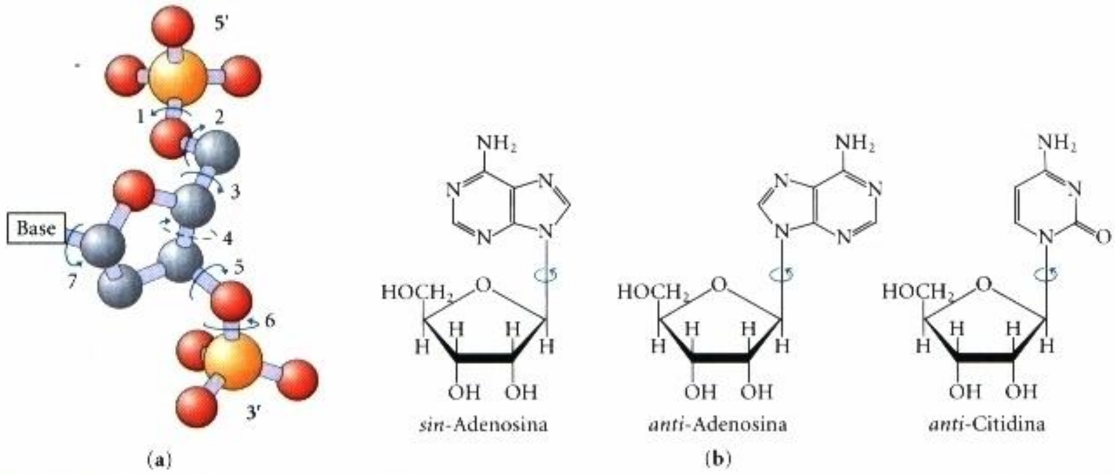
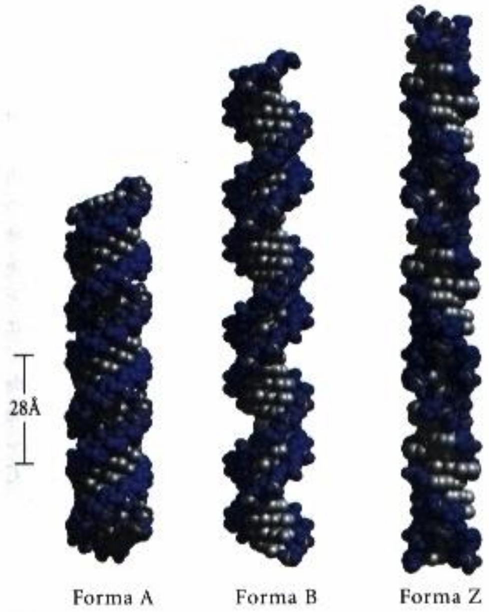


Figura 10-18 – Variações estruturais no DNA. (**a**) A conformação de um nucleotídeo no DNA é afetada pela rotação de cerca de sete diferentes ligações. Seis das ligações rodam livremente. A rotação limite por volta da ligação 4 dá origem a um anel pregueado, em que um dos átomos do anel furanosídico de cinco membros está fora do plano descrito pelos outros quatro. Esta conformação é descrita como endo ou exo, dependendo se o átomo estiver deslocado para o mesmo lado do plano como em C-5' ou do lado oposto (veja também a Fig. 10-3b). (**b**) Para as bases purínicas nos nucleotídeos, apenas duas conformações com respeito às unidades de ribose ligadas são estericamente permitidas, *anti* ou *sin*. As pirimidinas geralmente ocorrem na conformação *anti*.



	Forma A	Forma B	Forma Z
Sentido helicoidal	Mão direita	Mão direita	Mão esquerda
Diâmetro	~26Å	~20Å	~18Å
Pares de bases por volta da hélice	11	10,5	12
Degrau da hélice por par de base	2,6Å	3,4Å	3,7Å
Inclinação da base em relação ao eixo da hélice	20°	6°	7°
Conformação da prega do açúcar	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo para as pirimidinas; C-3' endo para as purinas
Conformação da ligação glicosilil	Anti	Anti	Anti para as pirimidinas; *sin* para as purinas

Figura 10-19 – Comparações entre as formas A, B e Z do DNA. Cada estrutura mostrada aqui possui 36 pares de bases. As bases estão mostradas em cinza, os átomos de fósforo em amarelo, as riboses e os oxigênios ligados ao fósforo em azul. O azul é a cor padrão usada para representar as fitas de DNA nos capítulos subseqüentes. A tabela resume algumas propriedades das três formas de DNA.

Certas seqüências de DNA adotam estruturas não usuais

Várias outras variações estruturais dependentes da seqüência foram detectadas em cromossomos grandes e podem afetar a função e o metabolismo de segmentos de DNA na sua vizinhança. Por exemplo, curvaturas ocorrem na hélice do DNA toda vez que quatro ou mais resíduos de adenosina aparecem seqüencialmente em uma fita. Seis adenosinas em fila produzem uma curvatura de cerca de 18°. A curvatura observada nesta e em outras seqüências pode ser importante para a ligação de algumas proteínas ao DNA.

Um outro tipo comum de seqüência encontrada no DNA é um **palíndromo.** Um palíndromo é uma palavra, frase ou sentença, soletrada identicamente quando lida numa ou noutra direção; dois exemplos são: RELER e ROMA ME TEM AMOR. O termo é aplicado a regiões do DNA em que há **repetições invertidas** da seqüência de bases com simetria dupla ocorrendo nas duas fitas do DNA (Fig. 10-20). Tais seqüências são autocomplementares em cada uma das fitas e, portanto, têm o potencial de formar estruturas do tipo **grampo** ou **cruciforme** (em forma de cruz; Fig. 10-21). Quando a repetição invertida ocorre em cada fita individual do DNA, a seqüência é chamada de **repetição em espelho.** Repetições em espelho não possuem seqüências complementares em uma mesma fita e não conseguem formar estruturas em grampo ou cruciformes. Seqüências desse tipo são encontradas virtualmente em toda molécula de DNA grande e podem envolver de alguns até milhares de pares de bases. Não se conhece quantos palíndromos ocorrem como cruciformes nas células, embora a existência de pelo menos algumas estruturas cruciformes tenham sido demonstradas *in vivo* na *E. coli.* Seqüências autocomplementares induzem que fitas únicas isoladas de DNA (ou RNA), em solução, dobrem-se em estruturas complexas contendo múltiplos grampos.

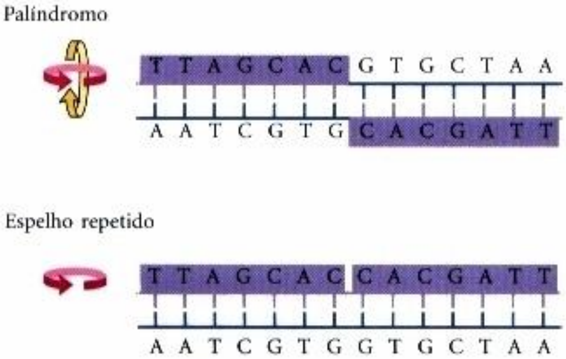
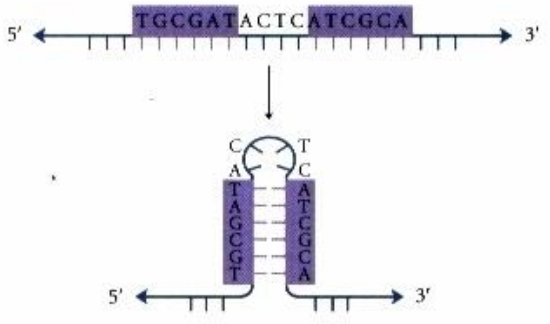
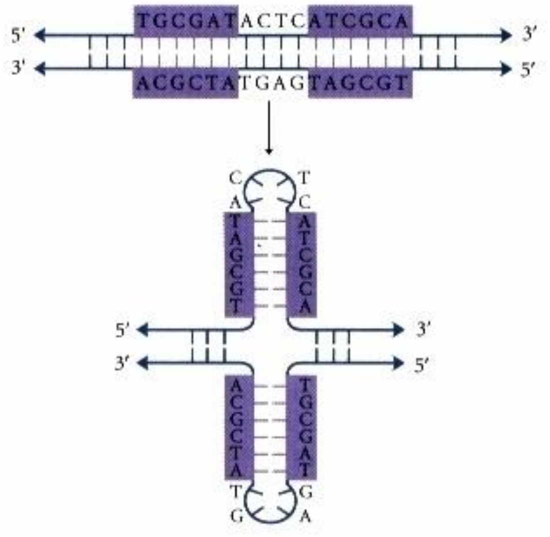

Palíndromo
T T A G C A C G T G C T A A
A A T C G T G C A C G A T T
Espelho repetido
T T A G C A C C A C G A T T
A A T C G T G G T G C T A A

Figura 10-20 – Palíndromos e repetições do tipo espelho. Os palíndromos são seqüências da fita dupla de ácidos nucléicos com simetria dupla. A fim de superpor uma repetição (seqüência sombreada) na outra, deve-se rodar 180° ao longo do eixo horizontal e então novamente sobre o eixo vertical, como mostrado pelas setas coloridas. Uma repetição do tipo espelho, por outro lado, possui uma seqüência simétrica em cada fita. Superpor uma repetição na outra requer apenas uma única rotação de 180° sobre o eixo vertical.



Grampo
(a)



Cruz
(b)

Figura 10-21 – Grampo e cruzes. Seqüências palindrômicas de DNA (ou RNA) podem formar estruturas alternativas com pareamento de bases na fita. (**a**) Quando apenas uma fita de DNA (ou RNA) for envolvida, ela é chamada de grampo. (**b**) Quando ambas as fitas estão envolvidas, a estrutura é chamada de cruz. O sombreado azul destaca as seqüências assimétricas que podem parear alternativamente com uma seqüência complementar, quer na mesma fita, quer na fita complementar.

Várias estruturas não usuais de DNA envolvem três ou até mesmo quatro fitas de DNA. Essas variações estruturais merecem investigação porque há uma tendência para muitas delas aparecerem em lugares onde eventos importantes no metabolismo do DNA (replicação, recombinação, transcrição) são iniciados ou regulados. Os nucleotídeos que participam em um pareamento de base Watson-Crick (Fig. 10-11) podem formar várias pontes de hidrogênio adicionais, particularmente com grupos funcionais ordenados no sulco principal. Por exemplo, um resíduo de citidina (se protonado) pode parear com um resíduo de guanosina de um par de nucleotídeos $G \equiv C$ e uma timidina pode parear com uma adenosina de um par $A{=}T$ (Fig. 10-22). O N-7, O^6 e N^6 das purinas, átomos que participam nas pontes de hidrogênio de DNA tríplex, são freqüentemente referidos como as **posições Hoogsteen**, e o pareamento que não é do tipo de Watson-Crick é chamado de **pareamento Hoogsteen**, pois foi Karst Hoogsteen, em 1963, que primeiro reconheceu o potenciamento para esses pareamentos não usuais. O pareamento Hoogsteen permite a formação de **DNAs tríplices**. Os tríplices mostrados na Figura 10-22a, b são mais estáveis em pH baixo, porque a trinca $C \equiv G \cdot C^+$ requer uma citosina protonada. No tríplex, o pK_a dessa citosina é >7,5, alterado do seu valor normal de 4,2. Os tríplex também são formados, mais facilmente, com longas seqüências contendo apenas pirimidinas ou apenas purinas em uma dada fita. Alguns DNAs tríplices contêm duas fitas de pirimidinas e uma fita de purina e outros contêm duas fitas de purina e uma fita de pirimidina.

Quatro fitas de DNA podem também parear para formar um tetraplex (também chamado de quadrúplex), mas isso ocorre facilmente apenas para as seqüências com uma proporção muito alta de resíduos de guanosina (Fig. 10-22c, d). O **tetraplex G** ou guanosina é bastante estável em uma grande variedade de condições. A orientação das fitas no tetraplex pode variar, como mostrado na Figura 10-22e.

Uma estrutura de DNA particularmente exótica, conhecida como **DNA H**, é encontrada em trechos de polipirimidinas ou polipurinas que também incorporam uma repetição do tipo espelho. Um exemplo simples é um longo trecho de resíduos T e C alternantes (Fig. 10-23). A estrutura DNA H caracteriza a fita tríplice ilustrada na Fig. 10-22a, b. Duas das três fitas na trípice hélice do DNA H contêm pirimidina e a terceira contém purinas.

No DNA das células vivas, sítios reconhecidos por muitas proteínas de ligação a seqüências específicas de DNA (Capítulo 28) são arranjados como palíndromos, e seqüências polipirimidínicas ou polipurínicas que podem formar hélices tríplices ou até mesmo DNA H são encontradas em regiões envolvidas na regulação da expressão de alguns genes eucarióticos. Em princípio, fitas de DNA sintéticas desenhadas para parear com essas seqüências para formar um DNA tríplex poderiam interromper a expressão gênica. Essa abordagem para controlar o metabolismo celular é de interesse comercial crescente pela sua aplicação potencial na medicina e agricultura.

RNAs mensageiros codificam cadeias polipeptídicas

Mudaremos agora, por um instante, a nossa atenção da estrutura do DNA para a expressão da informação genética contida no DNA. O RNA, a segunda forma principal de ácidos nucléicos nas células, possui muitas funções. Na expressão gênica, o RNA atua como um intermediário usando a informação codificada no DNA para especificar a seqüência de aminoácidos de uma proteína funcional.

Sabendo que o DNA dos eucariotos é principalmente confinado no núcleo, enquanto a síntese de proteínas ocorre nos ribossomos no citoplasma, alguma molécula diferente do DNA

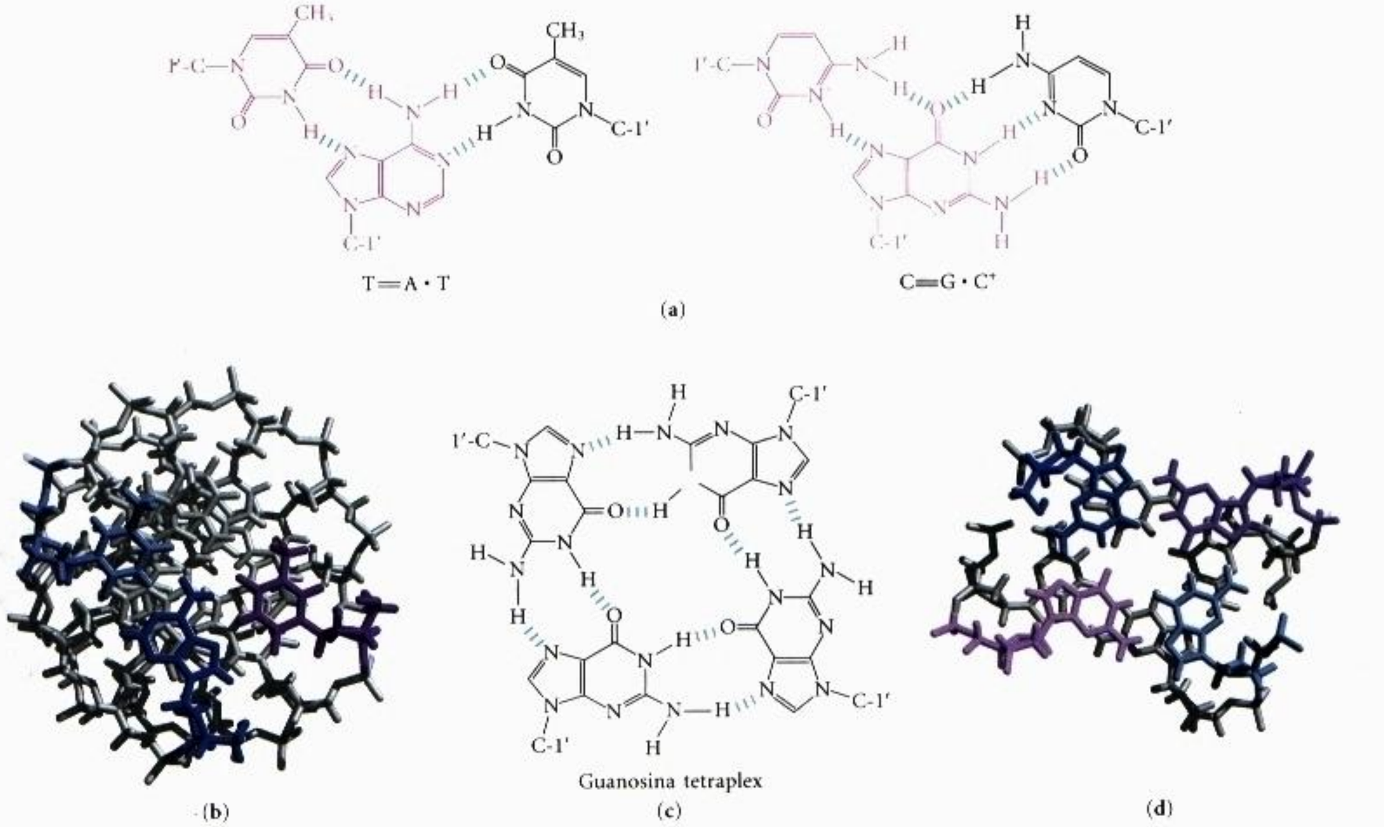
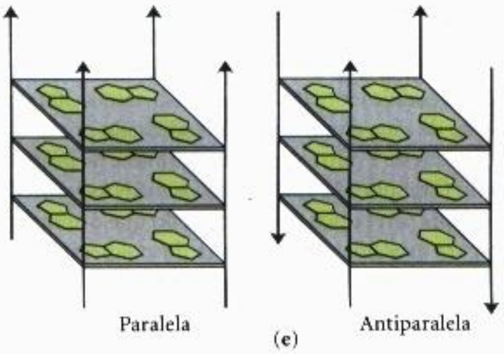

T═A • T
C≡G • C⁺
(a)
(b)
Guanosina tetraplex
(c)
(d)

Figura 10-22 – Estruturas de DNA contendo três ou quatro fitas de DNA. (**a**) Padrões de pareamento de bases em uma forma de DNA tríplex bem caracterizada. O par Hoogsteen em cada caso está mostrado em vermelho. (**b**) DNA de hélice tríplice contendo duas fitas pirimidínicas (poli(T)) e uma fita purina (poli(A)). As fitas azul-escura e azul-clara são antiparalelas e relacionadas pelos padrões de pareamento de bases normal Watson-Crick. A terceira (só pirimidina) fita (púrpura) é paralela à fita das purinas e pareada por pontes de hidrogênio diferentes das do tipo Watson-Crick. O triplex está visto pela extremidade, com cinco trincas mostradas. Apenas a trinca mais próxima do leitor está colorida. (**c**) Padrão de pareamento de bases na estrutura tetraplex da guanosina. (**d**) Duas quadras sucessivas de uma estrutura tetraplex G, vistas pelas extremidades, com a mais próxima do leitor em cores. (**e**) Variantes possíveis na orientação das fitas em um tetraplex G.


Paralela
(e)
Antiparalela

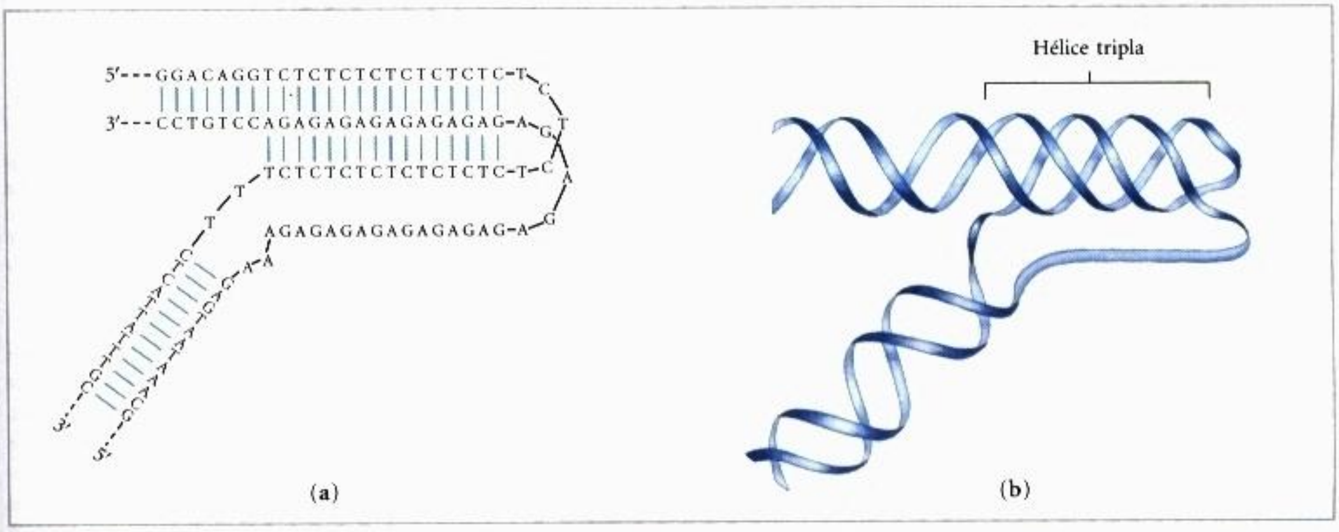

5′---GGACAGGTCTCTCTCTCTCTCTC-T
3′---CCTGTCCAGAGAGAGAGAGAGAG-A
TCTCTCTCTCTCTCTC-T-C
AGAGAGAGAGAGAGAG-A
3′
5′
(a)
Hélice tripla
(b)

Figura 10-23 – DNA H. Uma seqüência de resíduos alternados T e C pode ser considerada uma repetição do tipo espelho centrada em um dos resíduos centrais T ou C (**a**). Estas seqüências formam uma estrutura não usual em que as fitas em uma metade da repetição do tipo espelho são separadas e a fita contendo pirimidina (resíduos alternantes de T e C) dobra-se novamente na outra metade da repetição para formar a hélice tripla (**b**). A fita das purinas (resíduos alternados de A e G) é mantida não pareada. Esta estrutura produz uma curva abrupta no DNA.

deve transportar a mensagem genética do núcleo até o citoplasma. Desde o início de 1950, o RNA era considerado o candidato lógico: o RNA é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma e o aumento da síntese de proteínas é acompanhado por um aumento na quantidade de RNA no citoplasma e um aumento na sua taxa de renovação. Essas e outras observações levaram vários pesquisadores a sugerir que o RNA transportava a informação genética do DNA até a maquinaria da biossíntese de proteínas nos ribossomos. Em 1961, François Jacob e Jacques Monod apresentaram um quadro unificado (e essencialmente correto) de muitos aspectos desse processo. Eles propuseram o nome de RNA **mensageiro (mRNA)** para aquela porção do RNA total da célula que transportava a informação genética do DNA até os ribossomos, em que os mensageiros forneciam os moldes para a especificação da seqüência dos aminoácidos nas cadeias polipeptídicas. Embora os mRNAs de diferentes genes possam variar grandemente em comprimento, os mRNAs de um gene particular geralmente possuem um tamanho definido. O processo de formação do mRNA num molde de DNA é conhecido como transcrição.

Nos procariotos, uma única molécula de mRNA pode codificar uma ou várias cadeias polipeptídicas. Se ela transporta o código para apenas um polipeptídeo, o mRNA é **monocistrônico**, se ela codifica dois ou mais polipeptídeos, o mRNA é **policistrônico.** Nos eucariotos, a maioria dos mRNAs é monocistrônica. (O termo "cistron", para os propósitos desta discussão, refere-se a um gene. O termo em si possui raízes históricas na ciência da genética e sua definição formal está fora do escopo deste texto.) O comprimento mínimo de um mRNA é determinado pelo comprimento da cadeia polipeptídica que ele codifica. Por exemplo, a cadeia polipeptídica de 100 resíduos de aminoácidos requer uma seqüência codificadora de RNA de pelo menos 300 nucleotídeos, pelo fato de cada aminoácido ser codificado por uma trinca de nucleotídeos (este e outros detalhes da síntese de proteínas são discutidos no Capítulo 27). Entretanto, os mRNAs transcritos do DNA são sempre um pouco mais longos do que o simplesmente necessário para especificar a seqüência do polipeptídeo (ou seqüências). O RNA adicional, não-codificador, inclui seqüências que regulam a síntese de proteínas. A Figura 10-24 resume a estrutura geral dos mRNAs procarióticos.

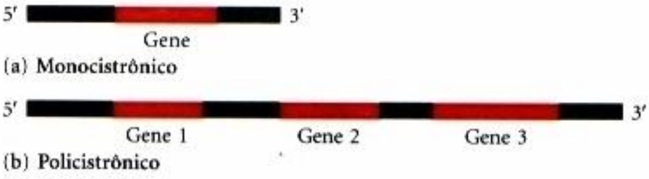


Figura 10-24 – mRNA procariótico. Diagramas esquemáticos dos mRNAs monocistrônico (**a**) e policistrônico (**b**) dos procariotos. Os segmentos em vermelho representam RNA codificando um produto gênico; os segmentos cinza-escuro representam RNA não-codificador. No transcrito policistrônico, RNAs não-codificadores separam os três genes.

Muitos RNAs possuem estruturas tridimensionais mais complexas

O RNA mensageiro é apenas uma das várias classes de RNA celular. RNAs de transferência funcionam como moléculas adaptadoras na síntese de proteínas; covalentemente unidos a um aminoácido numa extremidade, eles pareiam com o mRNA de tal forma que os aminoácidos são unidos a um polipeptídeo em crescimento numa seqüência correta. RNAs ribossômicos são componentes estruturais dos ribossomos. Há ainda uma grande variedade de RNAs de funções especiais, incluindo alguns (chamados de ribozimas) que possuem atividade enzimática. Todos eles serão considerados minuciosamente no Capítulo 26. As funções diversas e freqüentemente complexas desses RNAs refletem uma diversidade da estrutura muito mais rica do que aquela observada nas moléculas do DNA.

O produto de transcrição do DNA é sempre uma fita simples de RNA. As fitas simples tendem a assumir uma conformação helicoidal com o sentido da mão direita, que é dominada por interações do tipo empilhamento de bases (Fig. 10-25) que são mais fortes entre duas purinas do que entre uma purina e uma pirimidina ou entre duas pirimidinas. A interação purina-purina é tão forte que, quando uma pirimidina separa duas purinas, ela freqüentemente será deslocada do padrão de empilhamento de forma tal que as purinas possam interagir. Quaisquer seqüências autocomplementares na molécula levarão a estruturas mais complexas e específicas. O RNA pode parear suas bases com fitas complementares tanto de RNA quanto de DNA. As regras de pareamento das bases seguem o padrão daquelas para o DNA: G pareia com C e A pareia com U (ou com um ocasional resíduo de T em alguns RNAs). Uma diferença é que um pareamento de bases entre os resíduos G e U — não usual no DNA — é muito mais comum no RNA (veja Fig. 10-27). As fitas pareadas no RNA ou no dúplex RNA-DNA são antiparalelas, como no DNA.

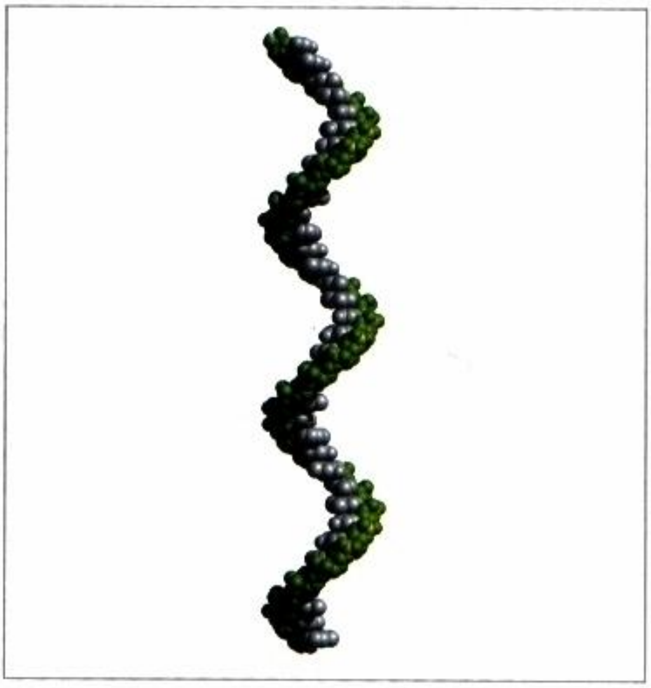


Figura 10-25 – Padrão típico de empilhamento segundo o enrolamento no sentido da mão direita, encontrado em uma fita única de RNA. As bases são mostradas em cinza, os átomos de fósforo em amarelo, e as riboses e os oxigênios dos fosfatos em verde. O verde é usado para representar as fitas de RNA nos capítulos subseqüentes, da mesma forma que o azul é usado para o DNA.

O RNA não possui uma estrutura secundária regular e simples que sirva como um ponto de referência, como é a dupla hélice do DNA. As estruturas tridimensionais de muitos RNAs, como aquelas das proteínas, são complexas e únicas. Interações fracas, especialmente interações de empilhamento de bases, desempenham um papel principal na estabilização das estruturas do RNA, da mesma forma que no DNA. Quando seqüências complementares estão presentes, a estrutura de fita dupla predominante é uma forma de dupla hélice do tipo A, que se enrola no sentido da mão direita. Hélices de forma Z têm sido obtidas no laboratório (sob condições salinas muito altas ou em alta temperatura). A forma B do RNA não tem sido observada. Quebras na hélice regular da forma A causadas por bases mal ou não pareadas em uma ou em ambas as fitas são comuns e resultam em saliências ou alças internas (Fig. 10-26). Alças em grampo formam-se entre seqüências quase autocomplementares na fita do RNA. O potencial para estruturas helicoidais pareadas por bases em muitos RNAs é muito grande (Fig. 10-27) e os grampos resultantes podem ser considerados o tipo mais comum de estrutura secundária no RNA. Seqüências de bases curtas (por exemplo, UUCG) são freqüentemente encontradas nas extremidades dos grampos de RNA e são conhecidas como capazes de formar alças particularmente fortes e estáveis. Tais seqüências podem desempenhar um papel importante no enrolamento de uma molécula de RNA na sua estrutura tridimensional precisa. Importantes contribuições estruturais adicionais são feitas pelas pontes de hidrogênio que não fazem parte do pareamento de bases padrão de Watson-Crick. Por exemplo, o grupo 2'-hidroxila da ribose pode formar uma ponte de hidrogênio com outros grupos. Algumas dessas propriedades são evidentes na estrutura do RNA de transferência da fenilalanina de levedura — o tRNA responsável por inserir resíduos de Phe em polipeptídeos — e em duas enzimas de RNA ou ribozimas, cujas funções, como aquelas das enzimas protéicas, dependem da sua estrutura tridimensional (Fig. 10-28).

A análise da estrutura do RNA e a sua relação com a função é um campo emergente da investigação que tem muitas das complexidades de análise da estrutura da proteína. A importância da compreensão da estrutura do RNA cresce à medida que despertamos para o crescente número de funções das moléculas de RNA.

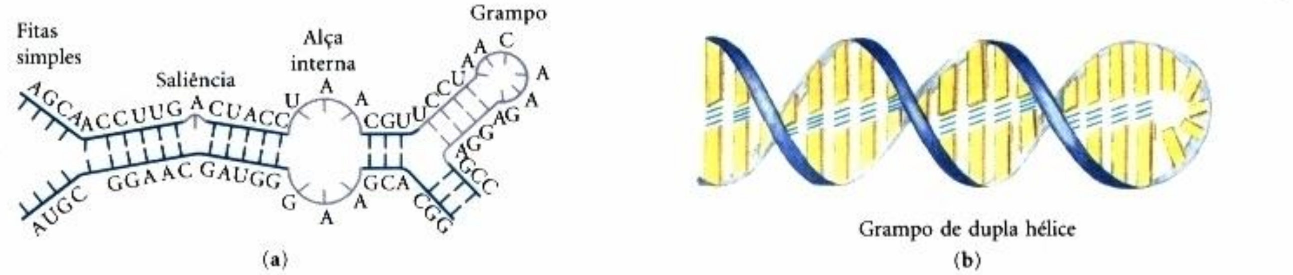


Figura 10-26 – Estruturas secundárias dos RNAs. (**a**) Saliência, alça interna e alça em grampo. As regiões pareadas geralmente possuem uma forma A de hélice, enrolada no sentido da mão direita, como mostrado para um grampo (**b**).

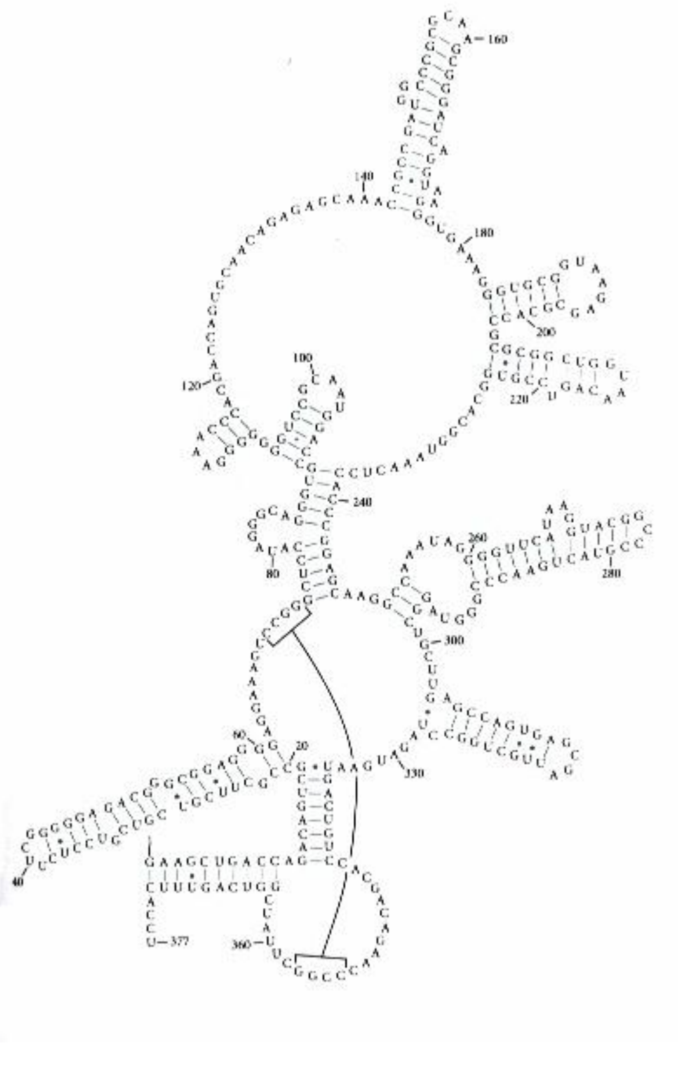
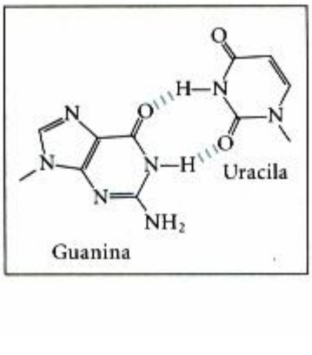


Figura 10-27 – Estruturas de pareamento de bases helicoidais no RNA. Possível estrutura secundária do componente de RNA M1 da enzima RNase P da *E. coli*, com muitos grampos. A RNase P, que também contém um componente protéico (não mostrado), funciona no processamento dos RNAs de transferência (Capítulo 26). Os dois colchetes indicam seqüências complementares adicionais que podem ser pareadas na estrutura tridimensional. Os pontos azuis indicam pares de bases G═U diferentes das de Watson-Crick (mostrado no quadro). Observe que os pares de bases G═U são permitidos apenas quando fitas pré-sintetizadas de RNA se dobram ou se anelam entre si. Não há nenhuma RNA polimerase que insira um U oposto a um molde G ou vice-versa durante a síntese de RNA.



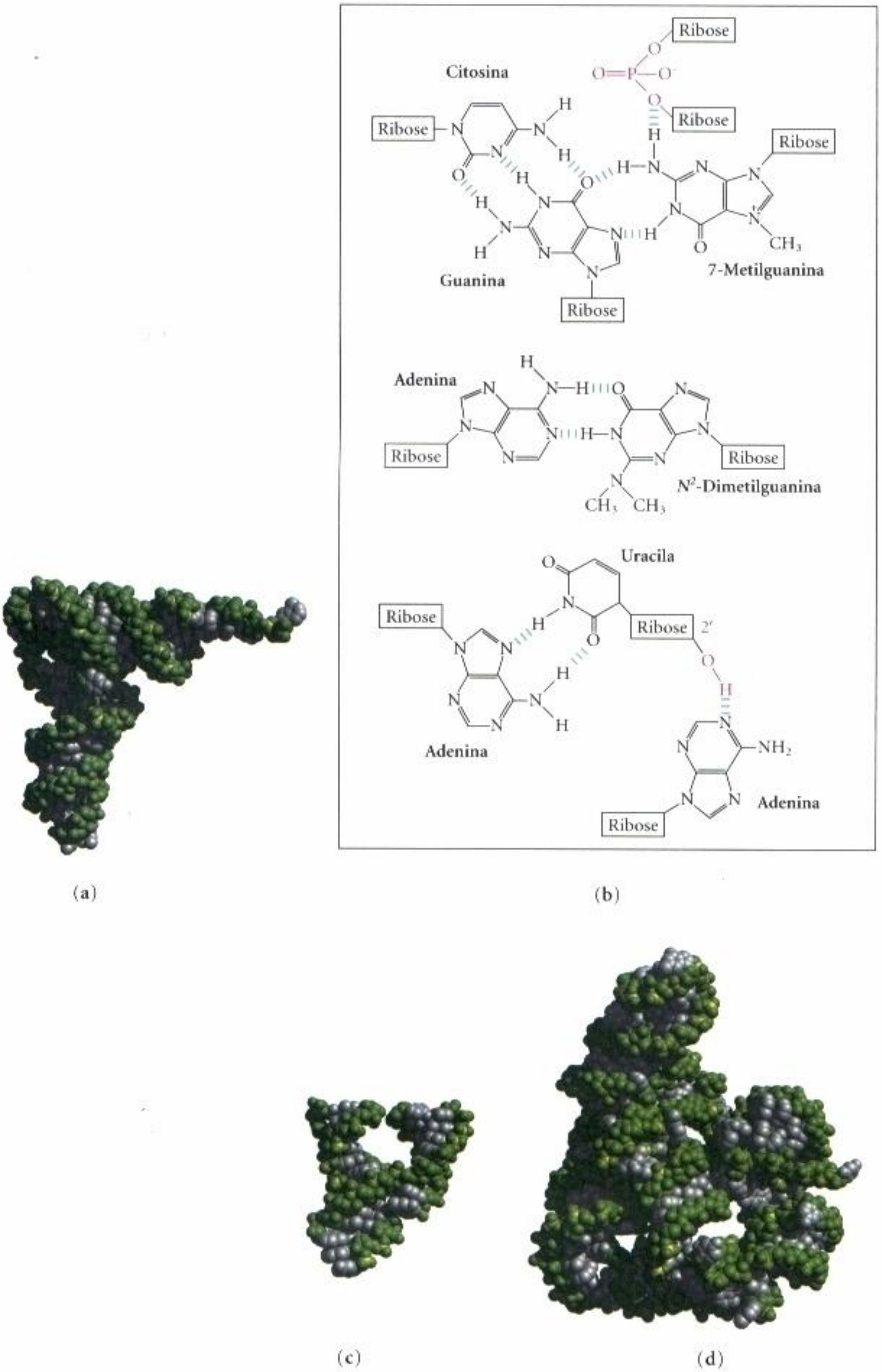

Citosina
Ribose
H
N
H
O
H
Guanina
N
Ribose
O=P—O⁻
Ribose
H
H—N
7-Metilguanina
CH₃
Adenina
N—H
Ribose
N²-Dimetilguanina
CH₃
CH₃
Uracila
Ribose
2′
NH₂
Adenina
(a)
(b)
(c)
(d)

Figura 10-28 – Estrutura tridimensional no RNA. (**a**) Estrutura tridimensional de um tRNA de fenilalanina de levedura. Alguns pareamentos de bases não usuais são encontrados nesse tRNA (**b**). Observe também o envolvimento de um oxigênio de uma ligação fosfodiéster num arranjo de ponte de hidrogênio e o envolvimento de um grupo 2′-hidroxila em outro (ambos em vermelho). (**c**) Uma ribozima cabeça-de-martelo (assim chamada porque a estrutura secundária do seu centro ativo parece com a cabeça de um martelo), derivada de certos vírus de plantas. Ribozimas, ou enzimas de RNA, catalisam uma variedade de funções, primariamente no metabolismo do RNA. As estruturas tridimensionais complexas desses RNAs refletem a complexidade inerente na catálise, como descrita para as enzimas protéicas no Capítulo 8. (**d**) Um segmento de RNA conhecido como um íntron, do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*. Esse íntron (uma ribozima) catalisa sua própria excisão entre dois éxons numa fita de mRNA (íntrons e éxons são discutidos no Capítulo 26).

A Química do Ácido Nucléico

Para compreender como os ácidos nucléicos funcionam precisamos entender suas propriedades químicas bem como as suas estruturas. O DNA funciona bem como reservatório da informação genética, em parte por causa da sua inerente estabilidade. As transformações químicas que ocorrem são geralmente muito lentas na ausência de um catalisador enzimático. O armazenamento da informação por longos períodos sem alteração é tão importante para uma célula, que mesmo reações muito lentas que alteram a estrutura do DNA podem ser fisiologicamente significantes. Processos como carcinogênese e envelhecimento podem estar intimamente ligados ao lento acúmulo de alterações irreversíveis do DNA. Outras alterações não destrutivas, como a separação das fitas que devem preceder a replicação ou a transcrição, são também importantes. Além de fornecer esses discernimentos nos processos fisiológicos, nossa compreensão da química do ácido nucléico tem nos dado um conjunto poderoso de tecnologias que têm aplicações na biologia molecular, medicina e ciência forense. Examinaremos agora as propriedades químicas do DNA e algumas dessas tecnologias.

A dupla hélice do DNA e o RNA podem ser desnaturados

Soluções de DNA nativo cuidadosamente isoladas são altamente viscosas em pH 7,0 e à temperatura ambiente (25°C). Quando tal solução é submetida a extremos de pH ou a temperaturas acima de 80°C, sua viscosidade diminui rapidamente, indicando que o DNA sofreu uma alteração física. Da mesma forma que o calor e os extremos de pH causam desnaturação das proteínas globulares, elas também provocam a desnaturação ou fusão da dupla hélice do DNA. A ruptura das pontes de hidrogênio entre as bases pareadas e do empilhamento de bases induz o desenrolamento da dupla hélice para formar duas fitas simples, completamente separadas entre si ao longo de toda a extensão, ou parte da extensão (desnaturação parcial), da molécula. Nenhuma ligação covalente no DNA é quebrada (Fig. 10-29).

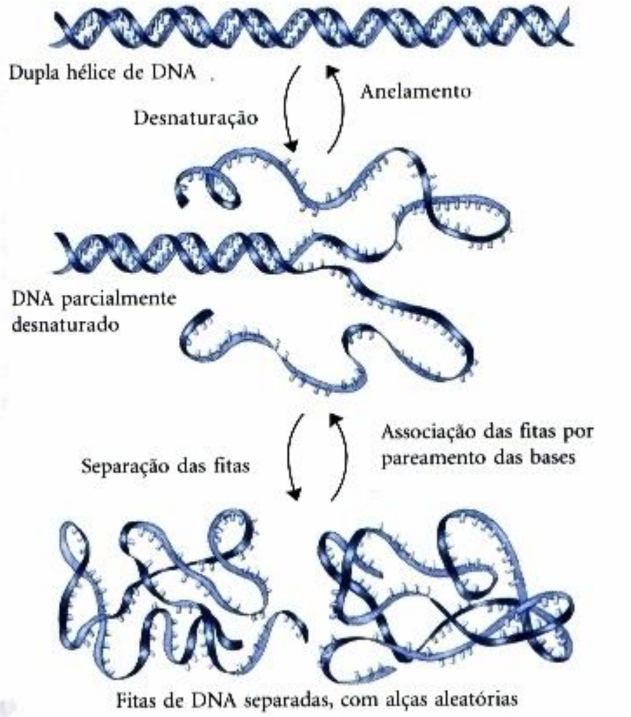

Dupla hélice de DNA
Desnaturação
Anelamento
DNA parcialmente desnaturado
Separação das fitas
Associação das fitas por pareamento das bases
Fitas de DNA separadas, com alças aleatórias

Figura 10-29 – Etapas na desnaturação reversível e no anelamento (renaturação) do DNA.

A renaturação de uma molécula de DNA é um processo rápido, de um passo, desde que um segmento de dupla hélice de uma dúzia ou mais de resíduos ainda una as duas fitas. Quando a temperatura, ou o pH, retorna ao nível em que a maioria dos organismos vive, os segmentos desenrolados das duas fitas se enrolam novamente ou se **anelam** para produzir o dúplex intacto (Fig. 10-29). Entretanto, se as duas fitas estão completamente separadas, a renaturação ocorre em dois passos. O primeiro passo é relativamente lento, porque as duas fitas devem primeiro "se encontrar" pela colisão ao acaso e formar um segmento curto de dupla hélice complementar. O segundo passo é muito mais rápido: as bases despareadas remanescentes entram sucessivamente em registro como pares de bases e as duas fitas se fecham como um "zíper", formando a dupla hélice.

A interação íntima entre as bases empilhadas num ácido nucléico diminui a sua absorção da luz UV em relação àquela de uma solução com a mesma concentração de nucleotídeos livres, e a absorção é menor quando dois ácidos nucléicos complementares são pareados. Isso é chamado de efeito hipocrômico. A desnaturação de uma fita dupla de ácidos nucléicos produz o resultado oposto, um aumento na absorção chamado de efeito hipercrômico. A transição de uma fita dupla de DNA a uma fita simples, forma desnaturada, pode portanto ser detectada pelo monitoramento da absorção da luz UV.

Moléculas de DNA viral ou bacteriano em solução desnaturam quando elas são aquecidas lentamente (Fig. 10-30). Cada espécie de DNA possui uma temperatura de desnaturação ca-

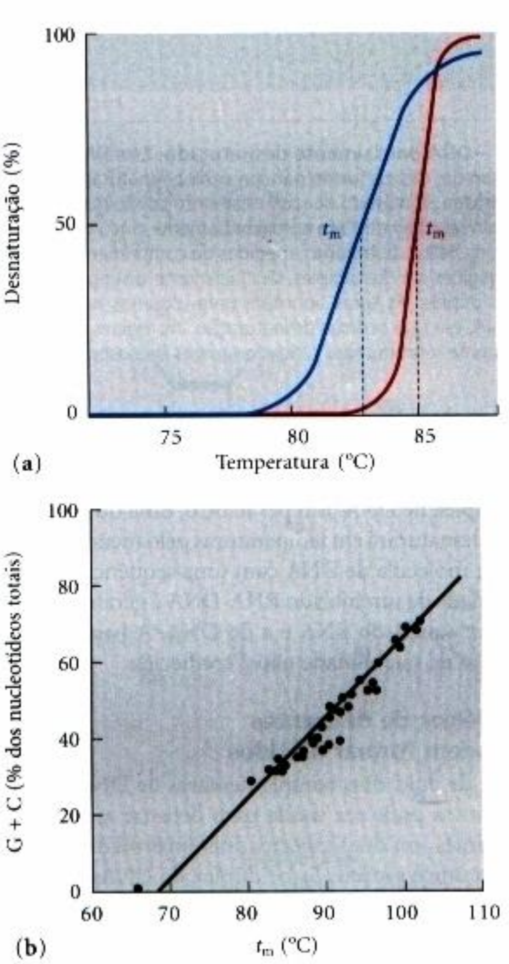


Figura 10-30 – Desnaturação térmica do DNA. (**a**) A desnaturação ou curva de fusão de dois espécimes de DNA. A temperatura no ponto médio de transição (t_m) é o ponto de fusão; o t_m depende do pH, da força iônica e do tamanho e da composição das bases do DNA. (**b**) Relações entre o t_m e o conteúdo G + C de um DNA.

racterística ou ponto de fusão (t_m): quanto maior o seu conteúdo de pares de bases G≡C maior o ponto de fusão do DNA. Isso porque os pares de bases G≡C, com três pontes de hidrogênio, são mais estáveis e requerem mais energia calorífica para dissociar do que os pares de bases A═T. A determinação cuidadosa do ponto de fusão de um espécime de DNA, em condições fixas de pH e força iônica, pode fornecer uma estimativa da sua composição em bases. Se as condições desnaturantes forem cuidadosamente controladas, as regiões que são ricas em pares de bases A═T serão especificamente desnaturadas, enquanto a maioria do restante do DNA permanecerá como fita dupla. Tais regiões desnaturadas (chamadas de bolhas) podem ser visualizadas à microscopia eletrônica (Fig. 10-31). A separação das fitas do DNA *precisa* ocorrer *in vivo* durante processos como a replicação e a transcrição. Como veremos, os sítios de DNA em que esses processos são iniciados são freqüentemente ricos em pares de bases A═T.

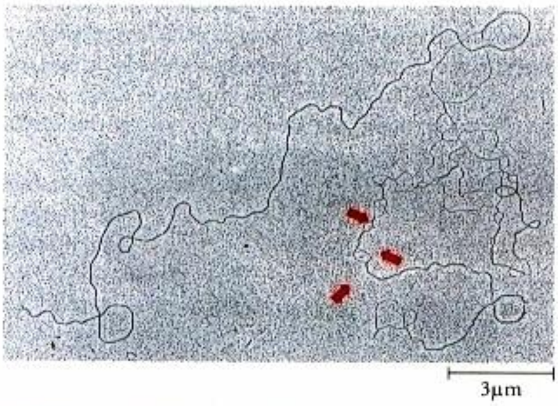


Figura 10-31 – DNA parcialmente desnaturado. Esse DNA foi parcialmente desnaturado, depois fixado para prevenir a renaturação durante o preparo da amostra. O método de sombreamento usado para visualizar o DNA aumenta o seu diâmetro em aproximadamente cinco vezes e oblitera os detalhes da hélice. Entretanto, medidas de comprimento podem ser obtidas e as regiões de fita simples são facilmente distinguíveis das regiões de fitas duplas. As setas apontam para algumas bolhas de fitas simples no DNA, em que ocorreu desnaturação. As regiões que desnaturam são altamente reproduzíveis e ricas em pares de bases A═T.

Dúplex de duas fitas de RNA, ou com uma fita de RNA e uma fita de DNA (híbridos RNA-DNA), podem também ser desnaturados. Notavelmente, os dúplex de RNA são mais estáveis que os dúplex de DNA. Em pH neutro, uma dupla hélice de RNA sempre desnaturará em temperaturas pelo menos 20°C mais altas que uma molécula de DNA com uma seqüência comparável. A estabilidade de um híbrido RNA-DNA é geralmente intermediária entre aquela do RNA e a do DNA. A base física para essas diferenças de estabilidade não é conhecida.

Ácidos nucléicos de diferentes espécies podem formar híbridos

A capacidade de duas fitas complementares de DNA de parear uma com a outra pode ser usada para detectar seqüências de DNA semelhantes, em duas espécies diferentes ou dentro do genoma de uma única espécie. Se os dúplex de DNAs isolados de células humanas e de células de camundongos forem completamente desnaturados pelo calor e então misturados e mantidos a 65°C por muitas horas, muito do DNA se anelará. A maioria das fitas do DNA de camundongo se anelará com fitas complementares do DNA de camundongo; semelhantemente, muitas das fitas do DNA humano se anelarão com fitas complementares do DNA humano. Entretanto, algumas fitas do DNA de camundongo se associarão com fitas de DNA humano produzindo **dúplex híbridos**, em que segmentos da fita do DNA de camundongo formam regiões de pares de bases com segmentos da fita do DNA humano (Fig. 10-32). Isso reflete o fato de que diferentes organismos possuem uma herança evolucionária comum; eles geralmente possuem algumas proteínas e RNAs com funções semelhantes e, freqüentemente, estruturas similares. Em muitos casos, os DNAs que codificam essas proteínas e RNAs terão seqüências semelhantes. Quanto mais próxima a relação evolucionária entre as espécies, mais extensamente seus DNAs se hibridizarão. Por exemplo, o DNA humano hibridiza muito mais extensamente com o DNA do camundongo do que com o DNA da levedura.

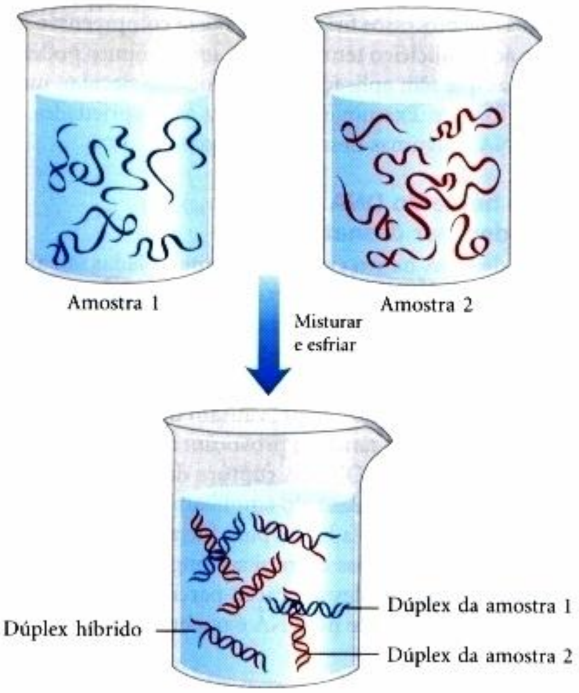


Figura 10-32 – Hibridização do DNA. Duas amostras de DNA a ser comparadas são completamente desnaturadas pelo aquecimento. Quando as duas soluções são misturadas e resfriadas lentamente, as fitas de DNA de cada amostra se associarão com a sua parceira complementar normal e se anelarão formando dúplex. Se os dois DNAs possuírem semelhança significante de seqüência, eles tenderão a formar dúplex parciais ou híbridos entre si: quanto maior a semelhança de seqüência entre os dois DNAs, maior o número de híbridos formados. A formação de híbridos pode ser medida de várias maneiras. Um dos DNAs é usualmente marcado com um isótopo radioativo para simplificar as medições.

A hibridização das fitas de DNA de diferentes fontes forma a base de um conjunto de técnicas poderosas, essenciais à prática moderna da genética molecular. É possível detectar uma seqüência específica de DNA ou gene na presença de muitas outras seqüências, se já tivermos uma fita de DNA complementar apropriada (usualmente marcada de alguma forma) para hibridizarmos com ela (Capítulo 29). O DNA complementar pode ser de uma espécie diferente ou da mesma espécie; em alguns casos ele é sintetizado no laboratório, usando técnicas descritas posteriormente neste capítulo. Técnicas de hibridização podem variar para detectar um RNA específico em vez de um DNA. O isolamento e a identificação de genes específicos e RNAs baseiam-se nessas técnicas, e novas aplicações dessa tecnologia têm permitido identificar acuradamente um indivíduo, baseando-se num único cabelo deixado na cena do crime, ou predizer o início de alguma doença num indivíduo décadas antes de os sintomas aparecerem (veja Adendo 29-1).

Nucleotídeos e ácidos nucléicos sofrem transformações não-enzimáticas

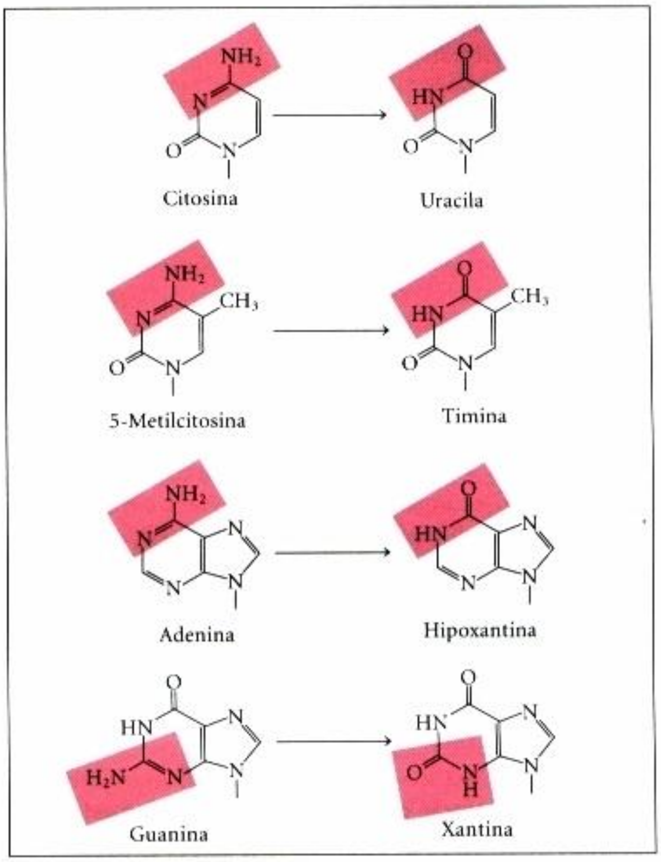
Purinas e pirimidinas, junto com os nucleotídeos dos quais fazem parte, sofrem algumas reações envolvendo a alteração espontânea da sua estrutura covalente. A velocidade dessas reações é geralmente *muito lenta*, mas elas são fisiologicamente significantes, por causa da tolerância muito baixa da célula para alterações na informação genética. Alterações na estrutura do DNA que levam a alterações permanentes na informação genética codificada são chamadas de **mutações**, e muitas evidências sugerem uma ligação íntima entre o acúmulo de mutações e os processos de envelhecimento e da formação do câncer.

Várias bases sofrem perda espontânea dos seus grupos aminoexocíclicos (desaminação, Fig. 10-33a). Por exemplo, em condições encontradas numa célula típica, a desaminação da citosina (no DNA) em uracila ocorrerá em cerca de uma em cada 10^7 citosinas em 24 horas. Isso corresponde a cerca de 100 eventos espontâneos por dia, em média, numa célula de mamífero. A desaminação da adenina e da guanina é cerca de 100 vezes mais lenta.

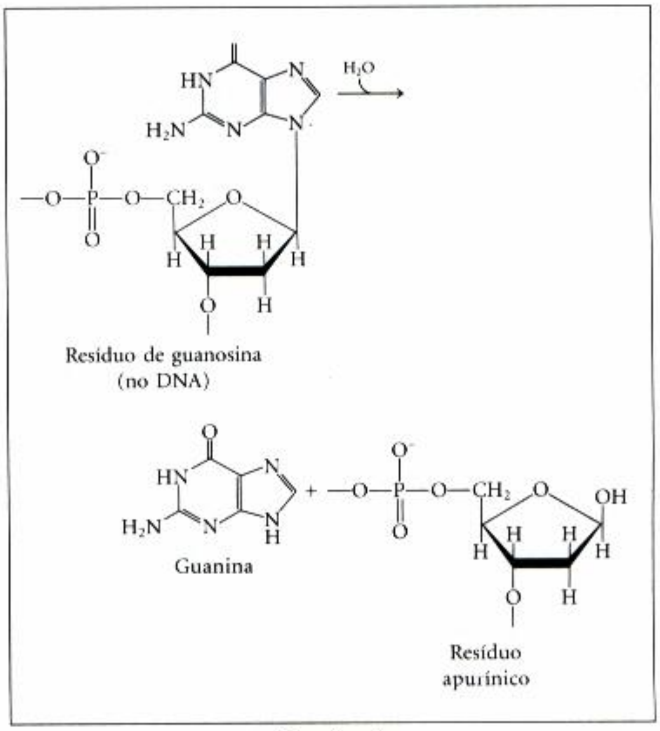
A reação da desaminação da citosina parece inócua, entretanto é quase certamente a razão pela qual o DNA contém timina em vez de uracila. O produto da desaminação da citosina (a uracila) é facilmente reconhecido como estranho ao DNA e é removido por um sistema de reparo (Capítulo 25). Se o DNA normalmente contivesse uracila, o reconhecimento das uracilas resultantes da desaminação da citosina seria mais difícil e as uracilas não-reparadas levariam às alterações permanentes de seqüência, quando fossem pareadas com adeninas durante a replicação. A desaminação da citosina levaria gradualmente a um decréscimo nos pares de bases $G{\equiv}C$ e em um aumento nos pares de bases $A{=}U$ no DNA de todas as células. Ao longo dos milênios, a desaminação da citosina eliminaria os pares de bases $G{\equiv}C$, assim como o código genético que dependesse deles. Estabelecer a timina como uma das quatro bases no DNA pode bem ter sido um dos pontos-chave na evolução, tornando possível o armazenamento a longo prazo da informação genética.

Uma outra reação importante nos desoxinucleotídeos é a hidrólise da ligação *N*-β-glicosídica entre a base e a pentose (Fig. 10-33b). Isso ocorre muito mais rápido para as purinas que para as pirimidinas. No DNA, uma em cada 10^5 purinas (10.000 por célula de mamífero) é perdida a cada 24 horas em condições celulares típicas. A depurinação dos ribonucleotídeos e RNA é muito mais lenta e geralmente não é considerada fisiológica. No tubo de ensaio, a perda das purinas pode ser acelerada por ácido diluído. A incubação de DNA em pH 3,0 provoca a remoção seletiva das bases purinícas, resultando em um derivado chamado de ácido apurínico.

Outras reações são promovidas pela radiação. A luz UV induzirá a condensação de dois grupos etilenos para formar um anel ciclobutano. Na célula, a mesma reação ocorre entre bases pirimidínicas adjacentes nos ácidos nucléicos, formando dímeros ciclobutano de pirimidinas. Isso acontece mais freqüentemente entre resíduos de timina adjacentes na mesma fita do DNA (Fig. 10-34). Um segundo tipo de dímero de pirimidina, chamado de fotoproduto 6-4, é também formado durante a irradiação UV. A radiação ionizante (raios X e raios gama) pode provocar a abertura do anel e a fragmentação das bases com quebras no esqueleto covalente dos ácidos nucléicos.

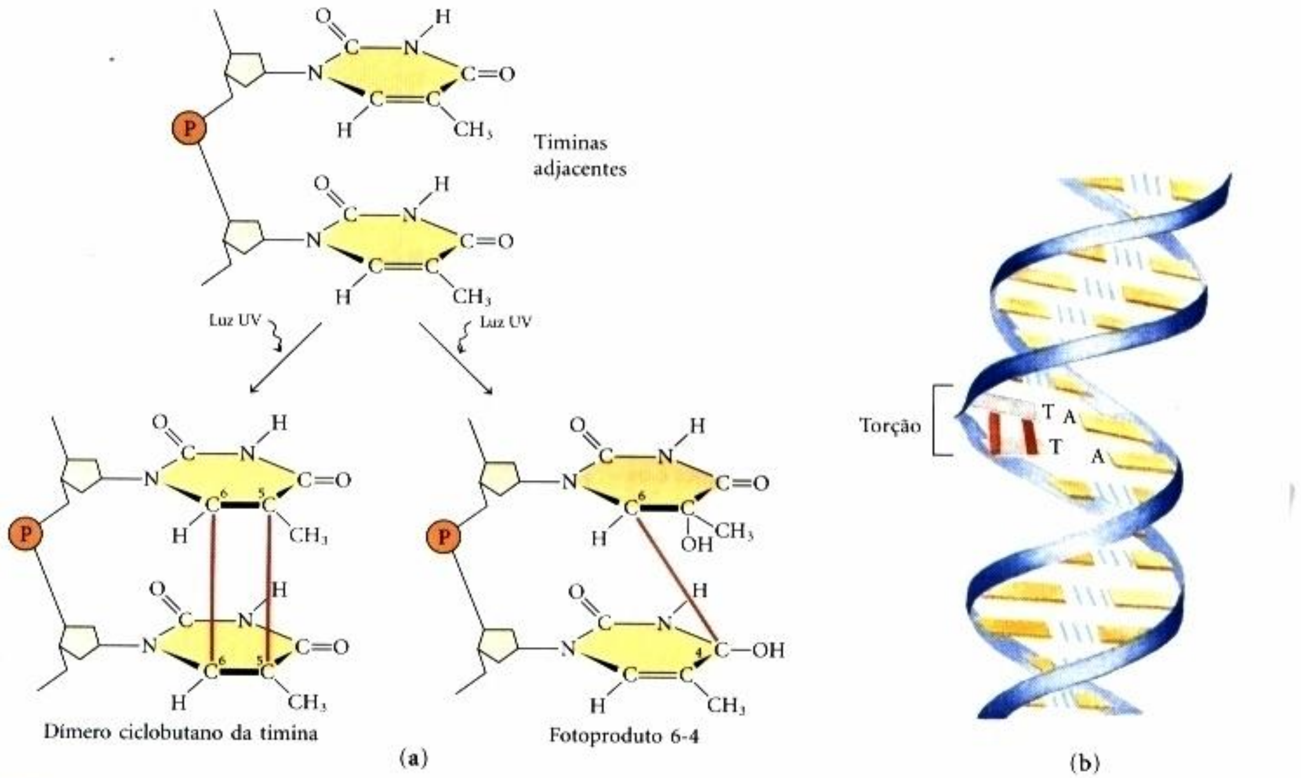


Desaminação
(a)



Depurinação
(b)

Figura 10-33 – Algumas reações não-enzimáticas bem caracterizadas dos nucleotídeos. (**a**) Reações de desaminação. Apenas a base é mostrada. (**b**) Depurinação, em que uma purina é perdida pela hidrólise da ligação *N*-β-glicosídica. A desoxirribose remanescente depois da depurinação é facilmente convertida da forma β-furanosídica para a forma aldeídica (veja Fig. 10-3). Outras reações não-enzimáticas são ilustradas nas Figuras 10-34 e 10-35.



Dímero ciclobutano da timina

Fotoproduto 6-4

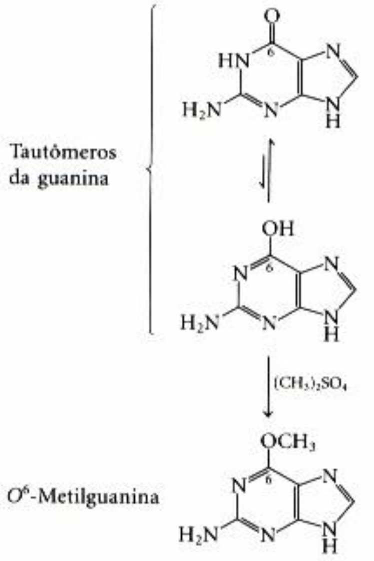
Figura 10-34 – Formação de dímeros de pirimidina induzidos pela luz UV. (**a**) Um tipo de reação (à esquerda) resulta na formação de um anel ciclobutil envolvendo o C-5 e o C-6 de resíduos de pirimidina adjacentes. Uma reação alternativa (à direita) resulta em um fotoproduto 6-4, com uma ligação entre o C-6 de um resíduo e o C-4 de seu vizinho. (**b**) Uma curvatura, ou enroscamento, é introduzida no DNA durante a formação de um dímero ciclobutano de timina.

Virtualmente todas as formas de vida são expostas a radiações de alta energia capazes de provocar alterações químicas no DNA. A radiação próxima à UV (entre os comprimentos de onda 200 e 400nm), que perfaz uma porção significante do espectro solar, pode provocar a formação do dímero de pirimidina e outras alterações químicas no DNA da bactéria e nas células da pele humana. Há um campo constante de radiação ionizante em volta de nós na forma de raios cósmicos, os quais podem penetrar profundamente na terra, bem como a radiação emitida por elementos radioativos como rádio, plutônio, urânio, radônio, ^{14}C e ^{3}H. Os raios X usados nos exames médicos e dentários e na radioterapia do câncer e de outras doenças são uma outra forma de radiação ionizante. Estima-se que as radiações UV e ionizante são responsáveis por cerca de 10% de todos os danos ao DNA provocados por agentes ambientais.

O DNA pode também ser danificado por reagentes químicos introduzidos no ambiente como produtos da atividade industrial. Tais produtos podem não ser lesivos *per se*, mas podem ser metabolizados pelas células em formas que o sejam. Duas classes proeminentes de tais agentes (Fig. 10-35) são: (1) agentes desaminantes, particularmente o ácido nitroso (HNO_2) ou compostos que podem ser metabolizados em ácido nitroso ou nitritos e (2) agentes alquilantes.

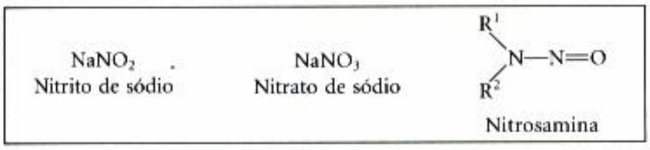
O ácido nitroso, formado a partir de precursores orgânicos, como nitrosaminas, e de nitrito e sais de nitrato, é um reagente potente que acelera a desaminação das bases descritas anteriormente. O bissulfito possui efeitos similares. Ambos os agentes são usados como preservativos nos alimentos processados para prevenir o crescimento de bactérias tóxicas. Eles não parecem aumentar significativamente os riscos de câncer, quando usados nessa forma, talvez porque sejam usados em pequenas quantidades e sua contribuição aos níveis globais de danos ao DNA é pequena (o risco potencial à saúde apresentado por alimentos estragados, se esses preservativos não forem usados, é muito maior).

Os agentes alquilantes podem alterar certas bases do DNA. Por exemplo, a substância altamente reativa, o dimetilsulfato (Fig. 10-35b), pode metilar o resíduo de guanina produzindo O^6-metilguanina, que é incapaz de fazer pareamento de base com a citosina.

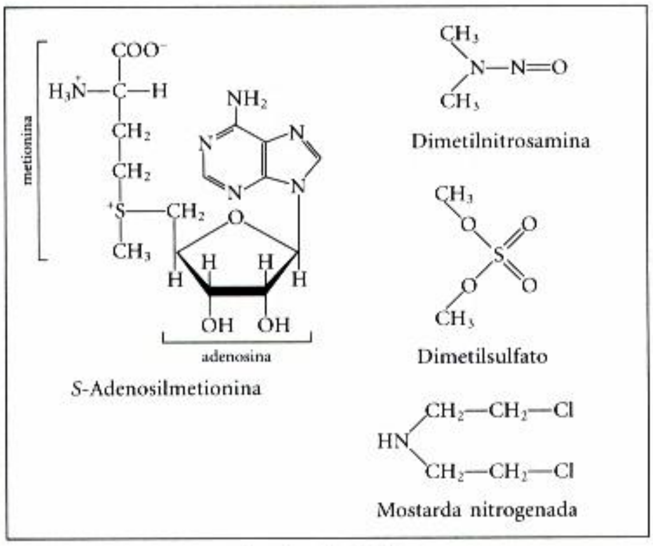


Muitas reações semelhantes são realizadas por agentes alquilantes normalmente presentes nas células, como a *S*-adenosilmetionina.

Possivelmente a fonte mais importante de alterações mutagênicas no DNA é a lesão oxidativa. Espécies excitadas pelo oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e radi-



Precursores do ácido nitroso
(a)



Agentes alquilantes
(b)

Figura 10-35 – Agentes químicos que causam dano ao DNA. (**a**) Precursores do ácido nitroso, que promove as reações de desaminação. (**b**) Agentes alquilantes.

cais superóxidos, originam-se durante a irradiação ou como subprodutos do metabolismo aeróbico. As células possuem um elaborado sistema de defesa para destruir essas espécies reativas, incluindo enzimas como a catalase e a superóxido dismutase, que convertem a espécie reativa do oxigênio em produtos inócuos. Entretanto, uma fração desses oxidantes inevitavelmente escapa das defesas celulares e o dano ao DNA envolve um grupo grande e complexo de reações que vai da oxidação do açúcar e das bases até a quebra das fitas. Estimativas acuradas da extensão dessa lesão não estão ainda disponíveis, mas é claro que a cada dia o DNA de cada célula humana é submetido a milhares de reações oxidativas lesivas.

Isso é simplesmente uma amostra das reações mais bem conhecidas que lesionam o DNA. Muitos compostos carcinogênicos presentes nos alimentos, água ou ar exercem seus efeitos causadores de câncer pela modificação das bases no DNA. Entretanto, a integridade do DNA como polímero é mais bem mantida que a do RNA ou proteína, pelo fato de o DNA ser a única macromolécula que possui sistemas bioquímicos de reparo. Esses processos de reparo (descritos no Capítulo 25) diminuem grandemente o impacto do dano ao DNA.

Algumas bases do DNA são metiladas

Certas bases nucleotídicas nas moléculas do DNA são enzimaticamente metiladas. A adenina e a citosina são metiladas mais freqüentemente que a guanina e a timina. A metilação é geralmente confinada a certas seqüências ou regiões de uma molécula de DNA. Em alguns casos a função da metilação é bem entendida, em outros a função ainda não é clara. Todas as metilases do DNA usam a *S*-adenosilmetionina como um grupo doador da metila. A *E. coli* possui dois sistemas de metilação proeminentes. Um funciona como parte de um mecanismo de defesa celular que ajuda a distinguir o seu DNA de um DNA estranho, marcando seu próprio DNA com grupos metil e destruindo o DNA (estranho) sem os grupos metil (isso é conhecido como um sistema de modificação-restrição, veja Capítulo 29). O outro sistema metila resíduos de adenina na seqüência (5')GATC(3') em N^6-metiladenosina (Fig. 10-5a). Isso é mediado pela enzima Dam (metilação da adenina do DNA, do inglês "*D*NA *a*denina *m*etilation") metilase, o componente de um sistema que repara pares de bases inadequados, formados ocasionalmente durante a replicação do DNA (Capítulo 25).

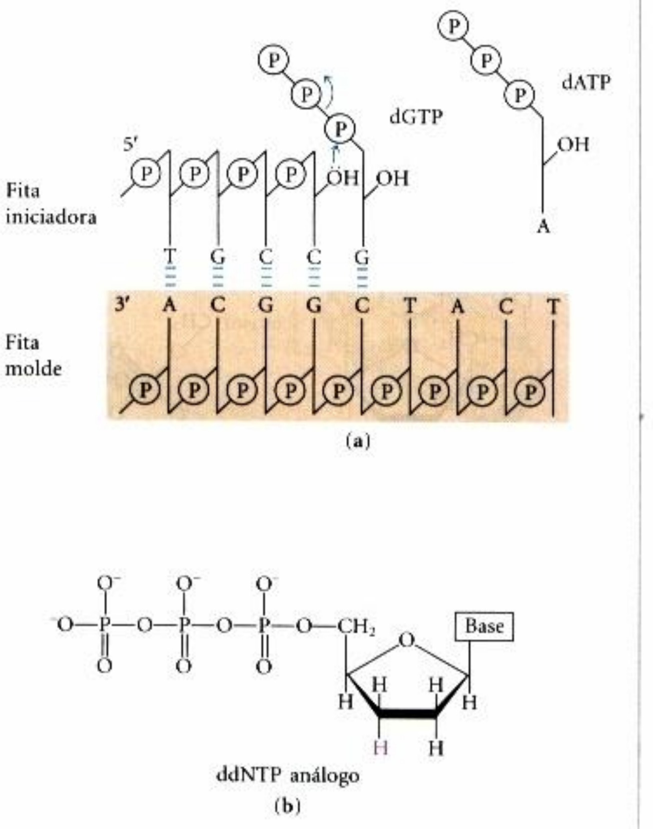
Nas células eucarióticas, cerca de 5% dos resíduos de citosina no DNA são metilados formando a 5-metilcitidina (Fig. 10-5a). A metilação é mais comum nas seqüências CpG, produzindo metil-CpG simetricamente em ambas as fitas do DNA. A extensão da metilação das seqüências CpG varia em diferentes regiões das grandes moléculas do DNA eucariótico. A metilação suprime a migração de segmentos de DNA chamados de transposons, descritos no Capítulo 25. Essas metilações da citosina também possuem significado estrutural. A presença da 5-metilcitosina numa seqüência CpG alternante aumenta marcadamente a tendência para que essa seqüência adquira a forma de Z.

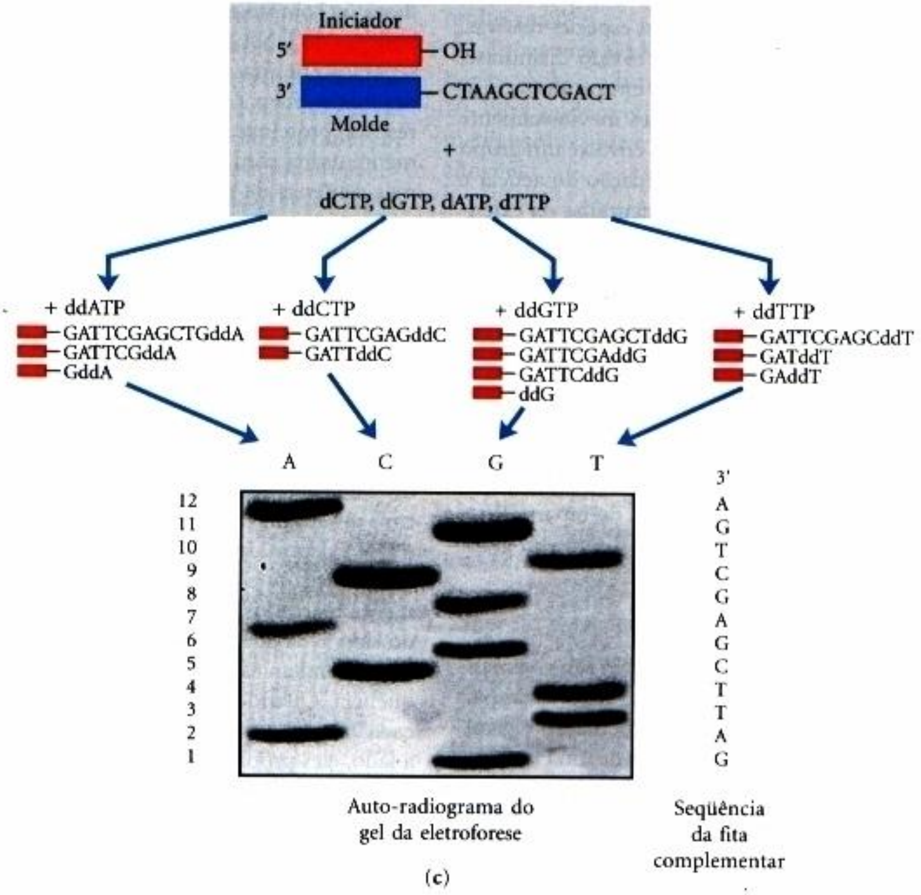
As seqüências de longas fitas de DNA podem ser determinadas

Na sua capacidade de reservatório da informação, a mais importante propriedade de uma molécula de DNA é a sua seqüência nucleotídica. Até o final dos anos 1970, obter-se a seqüência de um ácido nucléico contendo até mesmo 5 ou 10 nucleotídeos era difícil e muito trabalhoso. O desenvolvimento de duas novas técnicas, em 1977, uma por Alan Maxam e Walter Gilbert e a outra por Frederick Sanger, tornou possível seqüenciar moléculas de DNA cada vez maiores, com uma facilidade não imaginada algumas décadas atrás. As técnicas dependeram de uma melhora na compreensão da química dos nucleotídeos e no metabolismo do DNA e em métodos eletroforéticos que permitem a separação de fitas do DNA diferindo em tamanho por apenas um nucleotídeo. A eletroforese do DNA é semelhante à eletroforese das proteínas (veja Fig. 5-19). A poliacrilamida é freqüentemente usada como matriz do gel para DNAs curtos (até algumas centenas de nucleotídeos). A agarose é geralmente usada como matriz de géis para a separação de DNAs maiores.

Tanto no seqüenciamento de Sanger quanto no de Maxam-Gilbert, o princípio geral é reduzir o DNA a quatro conjuntos de fragmentos marcados. A reação que produz cada conjunto é base-específica, de forma que os comprimentos dos fragmentos correspondam a posições na seqüência do DNA onde uma certa base ocorre. Por exemplo, para um oligonucleotídeo com a seqüência pAATCGACT, marcado na extremidade 5' (a extremidade à esquerda), uma reação que quebre o DNA depois de cada resíduo de C irá gerar dois fragmentos marcados: um fragmento de quatro e um fragmento de sete nucleotídeos; uma reação que quebre o DNA depois de cada G irá produzir apenas um fragmento de cinco nucleotídeos. Pelo fato de os fragmentos serem radioativamente marcados nas suas extremidades 5', apenas o fragmento do lado 5' da quebra é visto no gel. Os tamanhos dos fragmentos correspondem às posições relativas dos resíduos de C e G na seqüência. Quando conjuntos de fragmentos correspondendo a cada uma das quatro bases são separados eletroforeticamente lado a lado, eles produzem uma escada de bandas a partir da qual a seqüência pode ser lida diretamente (Fig. 10-36). Ilustramos apenas o método de Sanger porque se provou que ele é tecnicamente mais fácil e é mais amplamente usado. Ele requer a síntese enzimática de uma fita de DNA complementar à fita a ser analisada, usando um "iniciador" marcado e didesoxinucleotídeos.

Figura 10-36 – Seqüenciamento do DNA pelo método de Sanger. Este método utiliza o mecanismo da síntese do DNA pelas DNAs polimerases (Capítulo 25). (**a**) As DNAs polimerases requerem tanto um iniciador (uma pequena fita de oligonucleotídeo), ao qual são adicionados os nucleotídeos, quanto uma fita molde para guiar a seleção de cada novo nucleotídeo. Nas células, o grupo 3'-hidroxila do iniciador reage com o desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) que chega, formando uma nova ligação fosfodiéster. O procedimento de seqüenciamento de Sanger usa análogos didesoxinucleosídeos trifosfatos (ddNTP) (**b**) para interromper a síntese do DNA. (O método de Sanger é também conhecido como o método do didesoxi.) Quando o ddNTP é inserido no lugar do dNTP, o alongamento da fita é interrompido depois que o análogo for adicionado porque ele não possui o grupo 3'-hidroxila necessário para o passo seguinte. (**c**) O DNA a ser seqüenciado é usado como fita molde e um pequeno iniciador, radioativa ou fluorescentemente marcado, é anelado nele. Adicionando-se pequenas quantidades de um único ddNTP, por exemplo ddCTP, a um sistema de reação até então normal, as fitas sintetizadas serão prematuramente terminadas nas localizações onde o dC normalmente ocorrerá. Pelo fato de haver muito mais dCTP do que ddCTP, há apenas uma pequena chance de que o análogo seja incorporado toda vez que um dC for adicionado. Entretanto, o ddCTP está presente em quantidades suficientes para garantir que cada nova fita tenha uma alta probabilidade de adquirir pelo menos um ddC em algum ponto durante a síntese. O resultado é uma solução contendo uma mistura de fragmentos marcados, cada um terminando com um resíduo de C. Cada resíduo de C na seqüência gera um conjunto de fragmentos de um tamanho particular, tal que os fragmentos de diferentes tamanhos, separados pela eletroforese, revelem a localização dos resíduos de C. Esse procedimento é repetido separadamente para cada uma das quatro ddNTPs, e a seqüência pode ser lida diretamente de um auto-radiograma do gel. Pelo fato de os fragmentos curtos do DNA migrarem mais rápido, os fragmentos perto da base do gel representam as posições dos nucleotídeos mais próximas ao iniciador (a extremidade 5') e a seqüência é lida (na direção 5'→3') a partir da base até o topo. Observe que a seqüência obtida é aquela da fita *complementar* à fita a ser analisada.


P
P
P
dATP
P
P
P
dGTP
5'
OH
P
P
P
P
OH
OH
Fita iniciadora
A
T
G
C
C
G
3'
A C G G C T A C T
Fita molde
P P P P P P P P P
(a)
O⁻
O⁻
O⁻
⁻O—P—O—P—O—P—O—CH₂
O
O
O
O
Base
H
H
H
H
H
H
ddNTP análogo
(b)


Iniciador
5'
OH
3'
CTAAGCTCGACT
Molde
+
dCTP, dGTP, dATP, dTTP
+ ddATP
GATTCGAGCTGddA
GATTCGddA
GddA
+ ddCTP
GATTCGAGddC
GATTddC
+ ddGTP
GATTCGAGCTddG
GATTCGAddG
GATTCddG
ddG
+ ddTTP
GATTCGAGCddT
GATddT
GAddT
A
C
G
T
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
3'
A
G
T
C
G
A
G
C
T
T
A
G
Auto-radiograma do gel da eletroforese
Seqüência da fita complementar

(c)

O seqüenciamento do DNA é facilmente automatizado, usando uma variação do método de seqüenciamento de Sanger, em que o didesoxinucleotídeo usado para cada reação é marcado com um sinal fluorescente de cor diferente (Fig. 10-37). Essa tecnologia permite que a seqüência de milhares de nucleotídeos possa ser obtida em algumas horas e projetos de seqüenciamento de DNA muito grandes possam ser contemplados. O mais ambicioso deles, agora em execução, é o Projeto Genoma Humano, em que todos os 3 bilhões de pares de bases do DNA de uma célula humana estão sendo seqüenciados.

A síntese química do DNA foi automatizada

Uma outra tecnologia que abriu o caminho para muitos avanços bioquímicos é a síntese química dos oligonucleotídeos com qualquer seqüência escolhida. Os métodos químicos para a síntese dos ácidos nucléicos foram desenvolvidos inicialmente por H. Gobind Khorana e seus colaboradores nos anos 1970. O refinamento e a automatização desses métodos tornaram possível sintetizar fitas de DNA rápida e precisamente. A síntese é realizada com a fita em crescimento ligada a um suporte sólido (Fig. 10-38), usando princípios semelhantes àqueles usados por Merrifield na síntese de peptídeos (veja Fig. 5-29). A eficiência de cada etapa de adição é muito alta, permitindo a síntese de polímeros de 70 ou 80 nucleotídeos rotineiramente no laboratório, e em alguns laboratórios fitas muito mais longas são sintetizadas. A disponibilidade de polímeros de DNA relativamente baratos, com seqüências previamente planejadas, está tendo um poderoso impacto em todas as áreas da bioquímica (Capítulo 29).

Outras Funções dos Nucleotídeos

Além do seu papel como subunidades dos ácidos nucléicos, os nucleotídeos possuem uma variedade de outras funções em cada célula: como transportadores de energia, componentes de cofatores enzimáticos e mensageiros químicos.

Os nucleotídeos transportam a energia química nas células

O grupo fosfato ligado covalentemente à 5'-hidroxila de um ribonucleotídeo pode possuir um ou dois fosfatos adicionais ligados. As moléculas resultantes são referidas como nucleosídeos mono, di e trifosfatos, respectivamente (Fig. 10-39). Começando da ribose, os três fosfatos são geralmente marcados como α, β e γ. A hidrólise dos nucleosídeos trifosfatos fornece a energia química para direcionar uma grande variedade de reações bioquímicas. O adenosina 5'-trifosfato, o ATP, é de longe o mais largamente usado para esse propósito, mas o UTP, o GTP e o CTP são também usados em algumas reações. Os nucleosídeos trifosfatos também funcionam como precursores ativados da síntese do DNA e do RNA, como será descrito nos Capítulos 25 e 26.

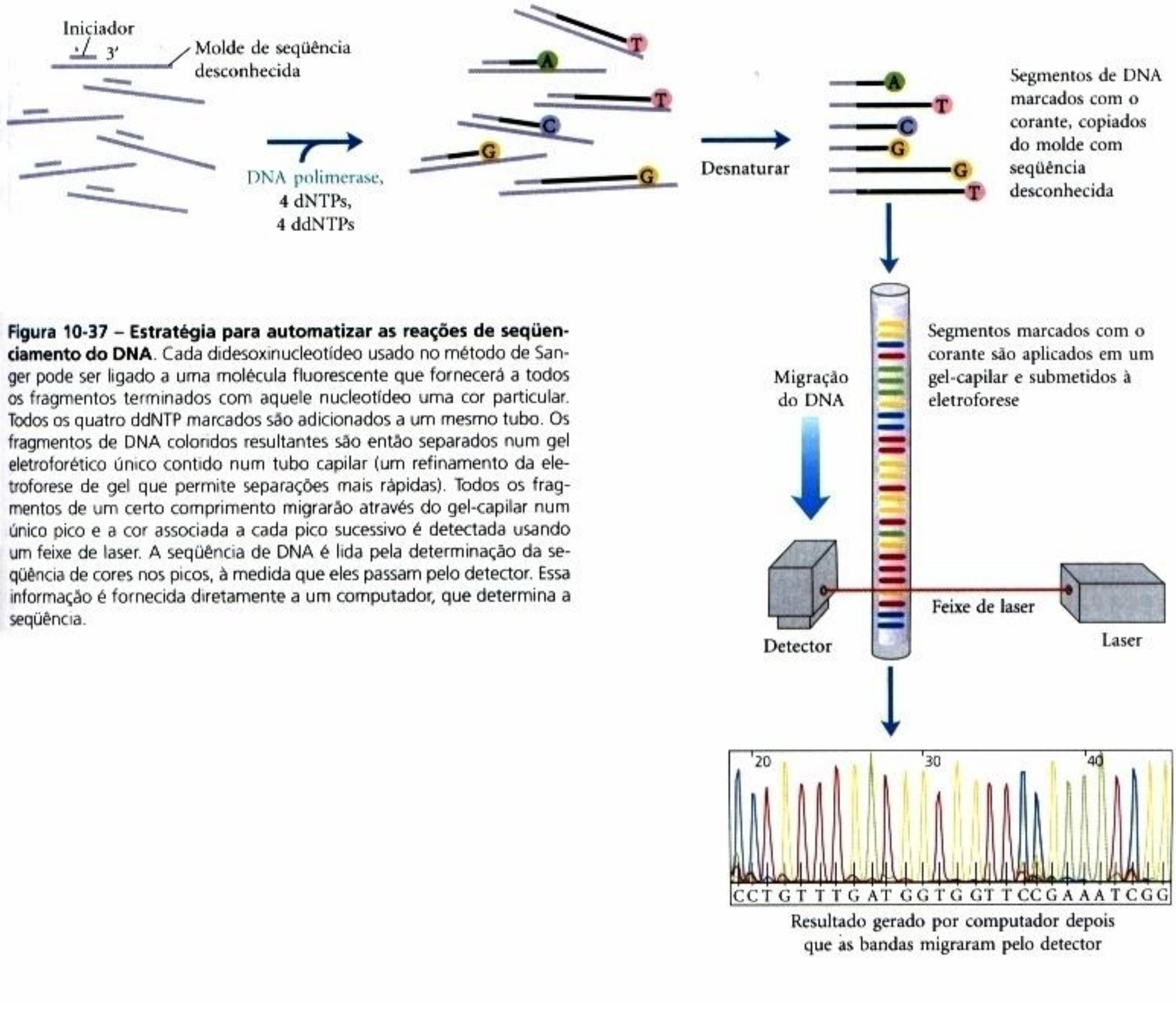
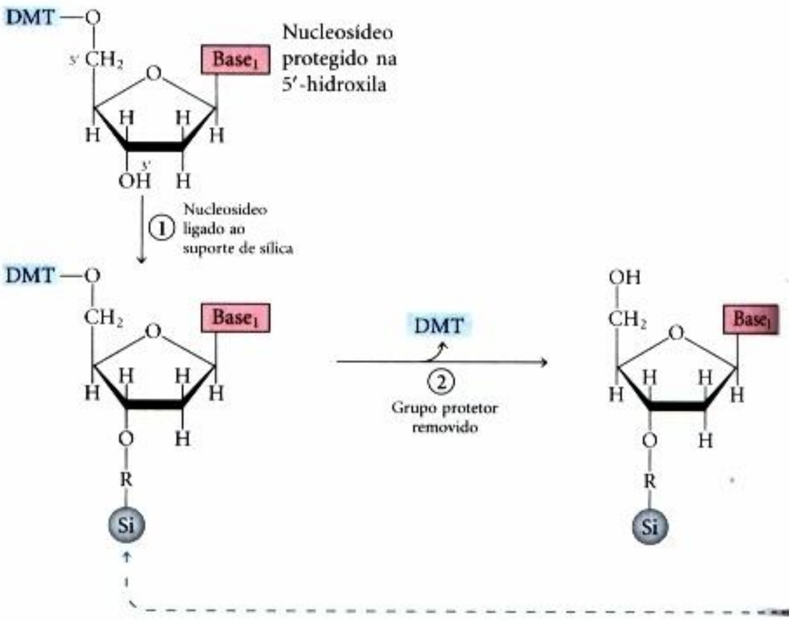
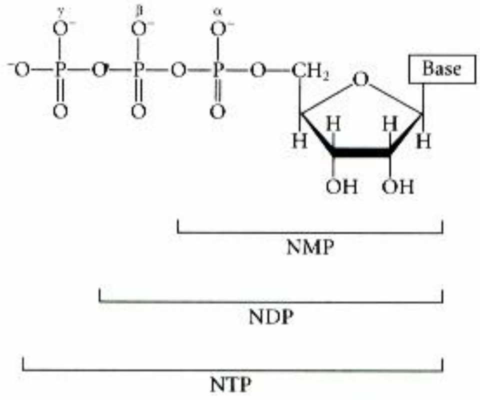

Iniciador
3'
Molde de seqüência desconhecida
DNA polimerase,
4 dNTPs,
4 ddNTPs
A
T
T
C
G
G
Desnaturar
A
T
C
G
G
T
Segmentos de DNA marcados com o corante, copiados do molde com seqüência desconhecida
Migração do DNA
Segmentos marcados com o corante são aplicados em um gel-capilar e submetidos à eletroforese
Feixe de laser
Detector
Laser
20
30
40
CCTGTTTGATGGTGGTTCCGAAATCGG
Resultado gerado por computador depois que as bandas migraram pelo detector

Figura 10-37 – Estratégia para automatizar as reações de seqüenciamento do DNA. Cada didesoxinucleotídeo usado no método de Sanger pode ser ligado a uma molécula fluorescente que fornecerá a todos os fragmentos terminados com aquele nucleotídeo uma cor particular. Todos os quatro ddNTP marcados são adicionados a um mesmo tubo. Os fragmentos de DNA coloridos resultantes são então separados num gel eletroforético único contido num tubo capilar (um refinamento da eletroforese de gel que permite separações mais rápidas). Todos os fragmentos de um certo comprimento migrarão através do gel-capilar num único pico e a cor associada a cada pico sucessivo é detectada usando um feixe de laser. A seqüência de DNA é lida pela determinação da seqüência de cores nos picos, à medida que eles passam pelo detector. Essa informação é fornecida diretamente a um computador, que determina a seqüência.

Figura 10-38 – Síntese química do DNA. A síntese automatizada do DNA é conceitualmente semelhante à síntese dos polipeptídeos no estado sólido. O nucleotídeo é construído num suporte sólido (sílica), um nucleotídeo por vez, numa série de reações químicas repetidas com precursores nucleotídicos adequadamente protegidos. ① O primeiro nucleotídeo (que será a extremidade 3') é ligado ao suporte de sílica pela 3'-hidroxila (por meio de um grupo de ligação R) e é protegido na 5'-hidroxila com um grupo dimetoxitritil ácido lábil (DMT). Os grupos reativos em todas as bases são também quimicamente bloqueados. ② O grupo protetor DMT é removido pela lavagem da coluna com ácido (o grupo DMT é colorido, de forma que essa reação pode ser seguida espectrofotometricamente). ③ O nucleotídeo seguinte é ativado com um grupo diisopropilamino e reage com o nucleotídeo ligado, formando uma ligação 5'-3' que na etapa ④ é oxidada com iodo produzindo uma ligação fosfotriéster. (Um dos oxigênios do fosfato carrega um grupo protetor cianoetil.) As reações ② a ④ são repetidas até que todos os nucleotídeos sejam adicionados. Em cada etapa, o nucleotídeo em excesso é removido antes da adição do nucleotídeo seguinte. Nas etapas ⑤ e ⑥, os grupos protetores remanescentes nas bases e os fosfatos são removidos e, em ⑦, o oligonucleotídeo é separado do suporte sólido e purificado. A química da síntese do RNA ficou muito atrás da síntese do DNA por causa das dificuldades em proteger a 2'-hidroxila da ribose sem efeitos adversos na reatividade da 3'-hidroxila.


DMT
5' CH₂
Base₁
3'
OH
Nucleosídeo protegido na 5'-hidroxila
① Nucleosídeo ligado ao suporte de sílica
DMT
Base₁
R
Si
DMT
② Grupo protetor removido
OH
CH₂
Base₁
R
Si



Abreviações de ribonucleosídeo 5'-fosfato			
Base	**Mono-**	**Di-**	**Tri-**
Adenina	AMP	ADP	ATP
Guanina	GMP	GDP	GTP
Citosina	CMP	CDP	CTP
Uracila	UMP	UDP	UTP

Abreviações de desoxirribonucleosídeo 5'-fosfato			
Base	**Mono-**	**Di-**	**Tri-**
Adenina	dAMP	dADP	dATP
Guanina	dGMP	dGDP	dGTP
Citosina	dCMP	dCDP	dCTP
Timina	dTMP	dTDP	dTTP

Figura 10-39 – Estrutura geral dos nucleosídeos 5'-mono, di e trifosfatos (NMPs, NDPs e NTPs) e suas abreviações-padrão. Nos desoxirribonucleosídeos fosfatos (dNMPs, dNDPs e dNTPs) a pentose é a 2'-desoxi-D-ribose.

A energia liberada pela hidrólise do ATP e outros nucleosídeos trifosfatos provém da estrutura do grupo trifosfato. A ligação entre a ribose e o fosfato α é uma ligação éster. As ligações α,β e β,γ são anidridos do ácido fosfórico (Fig. 10-40). A hidrólise da ligação éster produz cerca de 14kJ/mol, sob condições-padrão, enquanto a hidrólise de cada uma das ligações anidrídicas produz cerca de 30kJ/mol. A hidrólise do ATP freqüentemente desempenha um papel termodinâmico importante nas biossínteses. Quando acoplada a uma reação com uma variação de energia livre positiva, a hidrólise do ATP desloca o equilíbrio do processo global, favorecendo a formação do produto (recorde a relação entre a constante de equilíbrio e a variação de energia livre, descrita pela Equação 8-3 na pág. 193).

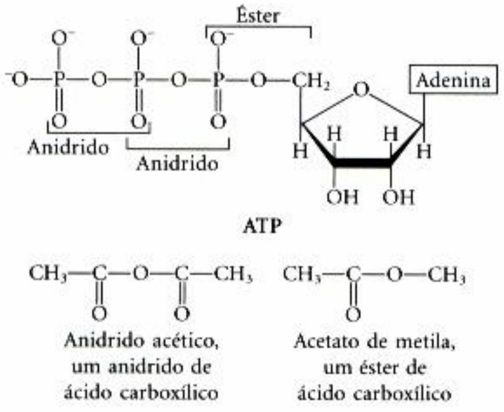
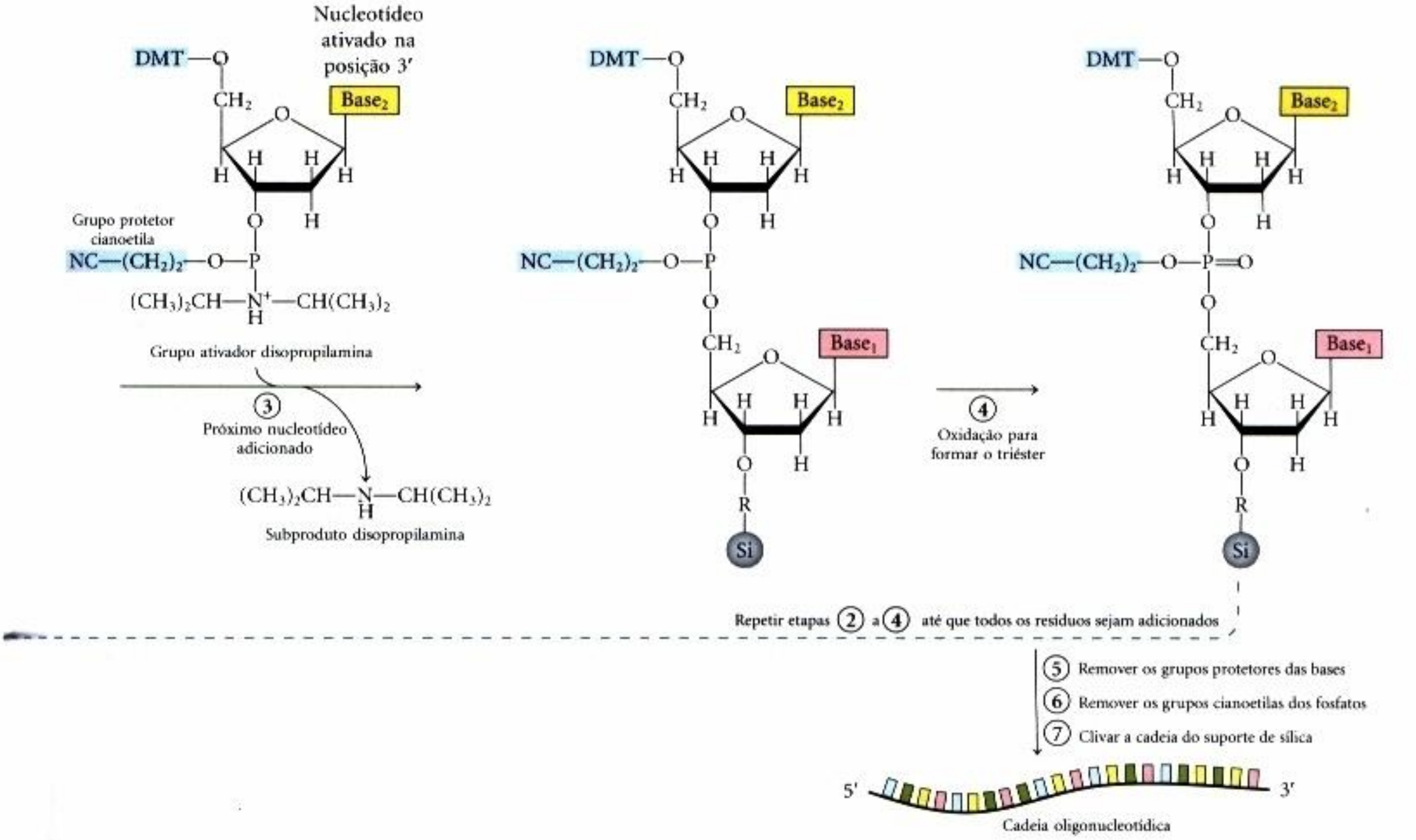

Éster
Adenina
Anidrido
Anidrido
OH OH
ATP
Anidrido acético, um anidrido de ácido carboxílico
Acetato de metila, um éster de ácido carboxílico

Figura 10-40 – As ligações éster de fosfato e as anidrido do ácido fosfórico do ATP. A hidrólise de uma ligação anidrido produz mais energia que a hidrólise do éster. Um anidrido e um éster de um ácido carboxílico são mostrados para comparação.


Nucleotídeo ativado na posição 3′
DMT—O
CH2
Base2
O
H
Grupo protetor cianoetila
NC—(CH2)2—O—P
(CH3)2CH—N+—CH(CH3)2
Grupo ativador disopropilamina
③
Próximo nucleotídeo adicionado
(CH3)2CH—N—CH(CH3)2
Subproduto disopropilamina
Base1
R
Si
④
Oxidação para formar o triéster
NC—(CH2)2—O—P=O
Repetir etapas ② a ④ até que todos os resíduos sejam adicionados
⑤ Remover os grupos protetores das bases
⑥ Remover os grupos cianoetilas dos fosfatos
⑦ Clivar a cadeia do suporte de sílica
5′
3′
Cadeia oligonucleotídica

Os nucleotídeos de adenina são componentes de muitos co-fatores enzimáticos

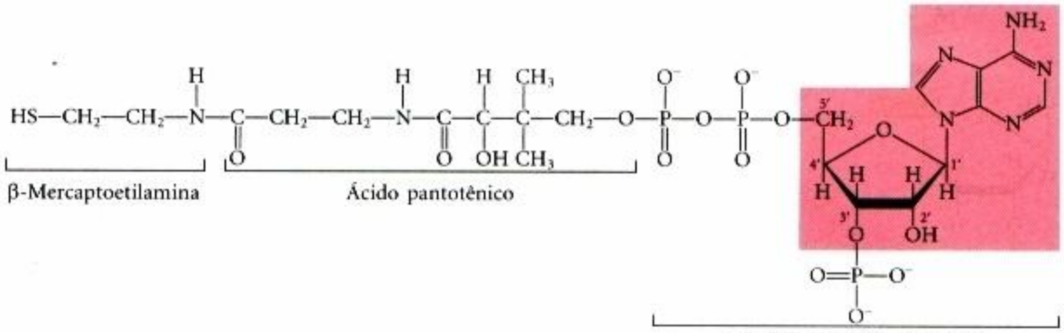
Uma variedade de co-fatores enzimáticos que ajudam um largo espectro de funções químicas incluem a adenosina como parte da sua estrutura (Fig. 10-41). Eles são estruturalmente não-relacionados, exceto pela presença da adenosina. Em nenhum desses co-fatores a porção adenosina participa diretamente da função primária, mas a remoção da adenosina dessas estruturas resulta em uma drástica redução de suas atividades. Por exemplo, a remoção do nucleotídeo da adenosina (3′-fosfoadenosina difosfato) do acetoacetil-CoA, derivativo da coenzima A do acetoacetato, reduz sua reatividade como substrato para a β-cetoacil-CoA transferase (uma enzima do metabolismo dos lipídios) por um fator de 10^6. Embora a razão para essa exigência de adenosina não tenha sido examinada minuciosamente, deve envolver a energia de ligação entre a enzima e o substrato (ou co-fator) que é usado tanto na catálise quanto para estabilizar o complexo inicial enzima-substrato (Capítulo 8). No caso da β-cetoacil-CoA transferase, a porção nucleotídea da coenzima A parece ser uma "alavanca" que ajuda a puxar o substrato (acetoacetil-CoA) para dentro do sítio ativo. Papéis semelhantes podem ser encontrados para a porção nucleosídica de outros co-fatores nucleotídeos.

Por que é a adenosina, em vez de alguma outra molécula maior, a usada nessas estruturas? A resposta pode envolver uma espécie de economia evolucionária. A adenosina certamente não é ímpar na quantidade de energia de ligação potencial que possa oferecer. A importância da adenosina provavelmente está não tanto em alguma característica química especial, mas sim na vantagem evolucionária de usar um composto para papéis múltiplos. Desde que o ATP se tornou a fonte universal da energia química, os sistemas evoluíram para sintetizar ATP em maior abundância do que outros nucleotídeos; pelo fato de ele ser abundante, tornou-se a escolha lógica para ser incorporado numa variedade de estruturas. A economia estende-se para a estrutura protéica. Um domínio protéico que liga adenosina pode ser usado numa grande variedade de enzimas. Tal estrutura, chamada de **dobra de ligação dos nucleotídeos**, é encontrada em muitas enzimas que ligam o ATP e co-fatores nucleotídicos.

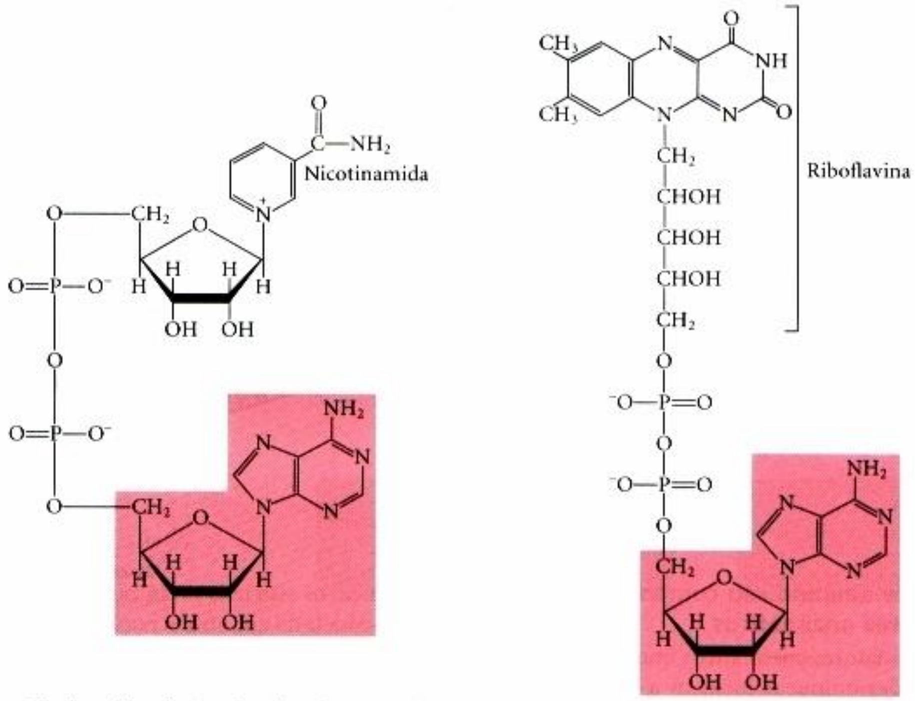
Alguns nucleotídeos são moléculas regulatórias

As células respondem a seu ambiente retirando informação de hormônios e outros sinais químicos no meio circundante. A interação desses sinais químicos extracelulares (mensageiros primários) com receptores na superfície celular freqüentemente leva à produção de **mensageiros secundários** dentro da célula que, por sua vez, leva às alterações adaptativas no interior da célula (Capítulo 13). Freqüentemente, o mensageiro secundário é um nucleotídeo (Fig. 10-42). Um dos mais comuns é o **adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico** (**AMP-cíclico, ou cAMP**), formado a partir do ATP numa reação catalisada pela adenilato ciclase, uma enzima associada com a face interna da membrana plasmática. O AMP-cíclico desempenha funções regulatórias virtualmente em toda célula fora do reino vegetal. O guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP) ocorre em muitas células e possui também funções regulatórias.

Um outro nucleotídeo regulador, o ppGpp (Fig. 10-42), é produzido por bactérias em resposta à diminuição na síntese protéica que ocorre durante a desnutrição. Esse nucleotídeo inibe a síntese das moléculas do rRNA e tRNA (veja Fig. 28-26) necessária para a síntese de proteínas, prevenindo a produção desnecessária dos ácidos nucléicos.


β-Mercaptoetilamina
Ácido pantotênico
3'-Fosfoadenosina difosfato
(3'-P-ADP)

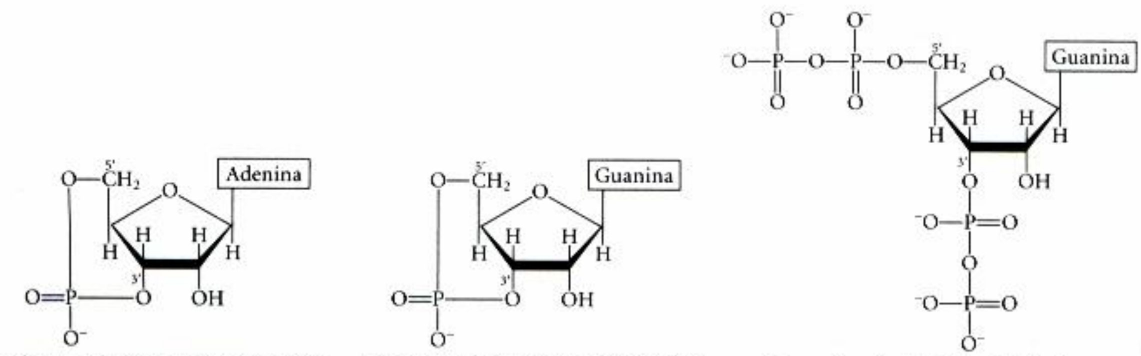
Coenzima A


Nicotinamida
Riboflavina

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+)

Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

Figura 10-41 – Algumas coenzimas que contêm a adenosina. A porção adenosina está sombreada em vermelho. A coenzima A (CoA) funciona nas reações de transferência de grupos acilas; o grupo acil (tal como o grupo acetil ou acetacetil) é ligado ao CoA por meio de uma ligação tioéster na porção β-mercaptoetilamina. O NAD^+ participa na transferência de hidretos; o FAD, a forma ativa da vitamina B_2 (riboflavina), participa na transferência de elétrons. Uma outra coenzima que incorpora adenosina na sua estrutura é a 5'-desoxiadenosilcobalamina, a forma ativa da vitamina B_{12} (veja Adendo 17-2), que participa na transferência intramolecular de grupos entre carbonos adjacentes.


Adenina
Guanina
Guanina

Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
(AMP-cíclico; cAMP)

Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
(GMP-cíclico; cGMP)

Guanosina 3'-difosfato, 5'-difosfato
(guanosina tetrafosfato)
(ppGpp)

Figura 10-42 – Três nucleotídeos regulatórios.

Resumo

Os nucleotídeos desempenham um conjunto diverso de funções importantes nas células. Como subunidades dos ácidos nucléicos eles transportam a informação genética. Eles são também os transportadores primários da energia química nas células, componentes estruturais de muitos co-fatores enzimáticos e mensageiros secundários celulares.

Um nucleotídeo consiste de uma base nitrogenada (purina ou pirimidina), um açúcar pentose e um ou mais grupos fosfatos. Os ácidos nucléicos são polímeros dos nucleotídeos, unidos por ligações fosfodiésteres entre a 5'-hidroxila de uma pentose e a 3'-hidroxila da seguinte. Há dois tipos de ácidos nucléicos: RNA e DNA. Os nucleotídeos no RNA contêm ribose e as bases pirimidínicas comuns são a uracila e a citosina. No DNA, os nucleotídeos contêm a 2'-desoxirribose e as bases pirimidínicas são geralmente a timina e a citosina. As purinas primárias, tanto no RNA quanto no DNA, são a adenosina e a guanosina.

Muitas linhas de evidência mostram que o DNA contém a informação genética. Em particular, o experimento de Avery-MacLeod-McCarty mostrou que o DNA isolado da cepa de uma bactéria podia entrar e transformar as células de uma outra cepa, dotando-a com algumas características herdáveis da doadora. O experimento de Hershey-Chase mostrou que o DNA de um vírus bacteriano, mas não sua capa protéica, transporta a mensagem genética para a replicação do vírus na célula hospedeira.

A partir dos estudos de difração de raios X de fibras do DNA realizados por Franklin e Wilkins e da equivalência de bases no DNA, descoberta por Chargaff (A = T e G = C), Watson e Crick postularam que o DNA nativo consiste de duas cadeias antiparalelas num arranjo de duplas hélices enroladas no sentido da mão direita. Pareamentos de bases complementares $A{=}T$ e $G{\equiv}C$ são formados por pontes de hidrogênio dentro da hélice e os esqueletos hidrofílicos açúcar-fosfato são localizados no exterior. Os pares de bases são empilhados perpendicularmente ao eixo longo, separados 3,4Å entre si; há cerca de 10,5 pares de bases em cada volta completa da dupla hélice.

O DNA pode existir em várias formas estruturais. Duas variações da forma B do DNA de Watson-Crick, as formas A e Z, têm sido caracterizadas em estruturas cristalinas do DNA. A hélice de forma A é mais curta e de diâmetro maior que uma hélice de forma B de mesma seqüência. A forma Z é uma hélice que se enrola no sentido da mão esquerda. Algumas variações estruturais dependentes da seqüência provocam curvatura no DNA. As fitas de DNA com repetições invertidas autocomplementares podem formar estruturas em grampo ou cruciformes. Alguns segmentos de polipirimidina ou polipurinas podem parear com fitas adicionais ou dúplex de seqüência apropriada para formar um DNA tríplex ou tetraplex. Trechos de polipirimidina arranjados em repetições do tipo espelho podem adquirir uma estrutura de tripla hélice, chamada de DNA H.

O RNA mensageiro é o veículo pelo qual a informação genética é transferida do DNA aos ribossomos para a síntese de proteínas. O RNA de transferência e o RNA ribossômico estão também envolvidos na síntese protéica. O RNA pode ser estruturalmente complexo, com fitas de RNA simples freqüentemente dobradas em grampos, regiões de fitas duplas e alças complexas.

O DNA nativo sofre desenrolamento reversível e separação (fusão) das fitas quando aquecido ou em extremos de pH. Pelo fato de os pares de bases $G{\equiv}C$ serem mais estáveis que os pares $A{=}T$, o ponto de fusão dos DNAs ricos em pares de $G{\equiv}C$ é maior que o dos DNAs ricos em pares $A{=}T$. Fitas simples de DNAs desnaturados de duas espécies podem formar um dúplex híbrido, o grau de hibridização dependendo da extensão da homologia de seqüência. A hibridização é a base para importantes técnicas usadas para estudar e isolar genes específicos e RNAs.

O DNA é um polímero relativamente estável. Reações espontâneas, como a desaminação de certas bases, a hidrólise das ligações *N*-glicosídicas entre açúcar–base, a formação de dímeros de pirimidina induzida por radiação e a lesão oxidativa, ocorrem em velocidades muito lentas, mas são importantes por causa da tolerância muito baixa das células por alterações no material genético. Seqüências de DNA podem ser determinadas e polímeros de DNA sintetizados, usando-se protocolos automatizados simples envolvendo métodos químicos e enzimáticos.

O ATP é o transportador central da energia química nas células. A presença da porção adenosina na estrutura de uma variedade de co-fatores enzimáticos pode também estar relacionada com as exigências da energia de ligação. O AMP-cíclico, formado a partir do ATP numa reação catalisada pela adenilato ciclase, é um mensageiro secundário comum, produzido em resposta a hormônios e outros sinais químicos.

Leitura Adicional

Geral

Chang KY & Varani G. (1997) Nucleic acids structure and recognition. *Nature Struct. Biol.* 4 (Suppl.), 854-858.

Descreve a aplicação do NMR para a determinação da estrutura do ácido nucléico.

Friedberg EC, Walker GC, & Siede W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma boa fonte para mais informações sobre a química dos nucleotídeos e ácidos nucléicos.

Hecht SM (ed). (1996) *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Oxford University Press, Oxford.

Um conjunto de artigos muito úteis.

Kornberg A & Baker TA. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

O melhor texto para começar a aprender mais sobre a estrutura do DNA.

Sinden RR. (1994) *DNA Structure and Function*, Academic Press, Inc., San Diego.

Boa discussão de muitos tópicos cobertos neste capítulo.

Variações na estrutura do DNA

Frank-Kamenetskii MD & Mirkin SM. (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 65-95.

Herbert A & Rich A. (1996) The biology of left-handed Z-DNA. *J. Biol. Chem.* **271**, 11.595-11.598.

Htun H & Dahlberg JE. (1989) Topology and formation of triple-stranded H-DNA. *Science* **243**, 1571-1576.

Moore PB. (1999) Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 287-300.

Schafer RH. (1998) Stability and structure of model DNA triplexes and quadruplexes and their interactions with small ligands. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 55-94.

Vasquez KM & Wilson JH. (1998) Triplex-directed modification of genes and gene activity. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 4-9.

Oligonucleotídeos sintéticos com seqüências apropriadas de apenas purinas ou apenas pirimidinas podem ser endereçados a seqüências complementares no genoma, formando tríplex estáveis para uma variedade de propósitos em biotecnologia.

Wells RD. (1988) Unusual DNA structures. *J. Biol. Chem.* **263**, 1095-1098.

Minirevisão, um resumo conciso.

ATP como transportador de energia

Jencks WP. (1987) Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 65-73.

Um artigo relativamente curto, cheio de discernimento.

Históricos

Judson HF. (1996) *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, edição expandida, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Olby RC. (1994) *The Path to the Double Helix: The Discovery of DNA*, Dover Publications, Inc., New York.

Sayre A. (1978) *Rosalind Franklin and DNA*. W.W. Norton & Co., Inc., New York.

Watson JD. (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*, W.W. Norton & Co., Inc., New York. [Edição capa mole (1981).]

Problemas

1. Determinação da concentração protéica pela absorção UV em uma solução contendo proteínas e ácidos nucléicos. A concentração de proteínas ou ácidos nucléicos em solução pode ser estimada usando as suas diferentes propriedades de absorção da luz: as proteínas possuem uma forte absorção centrada no comprimento de onda 280nm, enquanto os ácidos nucléicos absorvem mais fortemente em 260nm. Suas respectivas concentrações em uma mistura podem ser estimadas medindo-se a absorbância (A) da solução em 280nm e 260nm e usando-se a tabela a seguir, que fornece a $R_{280/260}$, a razão da absorbância em 280 e 260nm; a porcentagem da massa total que é de ácido nucléico; e um fator F, que corrige a leitura em A_{280} e fornece uma estimativa mais acurada da proteína. A concentração protéica (em mg/mL) = $F \times A_{280}$ (assumindo que a cubeta tem 1cm de largura). Calcule a concentração protéica em uma solução de $A_{280} = 0{,}69$ e $A_{260} = 0{,}94$.

$R_{280/260}$	Proporção de ácido nucléico (%)	F
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

2. Estrutura nucleotídica. Que posições no anel da purina de um nucleotídeo de purina no DNA possuem o potencial de formar pontes de hidrogênio, mas não estão envolvidas nos pareamentos de bases de Watson-Crick?

3. Seqüência de bases das fitas complementares de DNA. Uma fita da dupla hélice de DNA possui a seqüência (5')GCGCAATATTTCTCAAAATATTGCGC(3'). Escreva a seqüência de bases da fita complementar. Que tipo especial de seqüência está contido nesse segmento de DNA? A dupla fita de DNA possui o potencial de formar quaisquer estruturas alternativas?

4. O DNA do corpo humano. Calcule o peso em gramas de uma molécula de DNA dupla hélice esticada da Terra até a Lua (~320.000km). A dupla hélice de DNA pesa cerca de 1×10^{-18}g por 1.000 pares de nucleotídeos; cada par de bases tem 3,4Å de extensão. Para uma comparação interessante, seu corpo contém cerca de 0,5g de DNA!

5. Curvatura do DNA. Assuma que um trecho poli(A) com cinco pares de bases produza uma curvatura de cerca de 20°. Calcule a curvatura total produzida no DNA se os pares de bases centrais (o terceiro de cinco) de dois trechos sucessivos $(dA)_5$ estiverem localizados (a) 10 ou (b) 15 pares de bases separados. Assuma que há 10 pares de bases por volta na dupla hélice.

6. Distinção entre as estruturas do DNA e do RNA. Grampos podem-se formar nas seqüências palindrômicas de fitas simples de DNA ou RNA. Como a estrutura helicoidal de um grampo de RNA, longo e totalmene pareado (exceto na extremidade), difere daquela de um grampo de DNA?

7. Química dos nucleotídeos. Nas células de muitos organismos eucarióticos há sistemas altamente especializados que reparam especificamente pareamentos inadequados de G–T no DNA. Esse pareamento é reparado para formar um par de base $\mathrm{G{\equiv}C}$ (e não $\mathrm{A{=}T}$). Esse sistema de reparo de pareamento inadequado G–T ocorre em adição a um sistema mais geral que repara virtualmente todos os despareamentos. Você pode pensar em uma razão por que as células requerem um sistema especializado para reparar o pareamento inadequado de G–T?

8. Estrutura do ácido nucléico. Explique por que há um aumento na absorção da luz UV (efeito hipercrômico) quando a dupla fita de DNA é desnaturada.

9. Pareamento de base no DNA. Nas amostras de DNA isoladas de duas espécies não identificadas de bactéria, a adenina perfez 32% e 17% do total das bases, respectivamente. Quais proporções relativas de adenina, guanina, timina e citosina você esperaria encontrar nas duas amostras de DNA? Que suposições você fez? Uma dessas bactérias foi isolada de uma fonte quente (64°C). Qual DNA veio dessa bactéria termofílica? Qual foi a base para sua resposta?

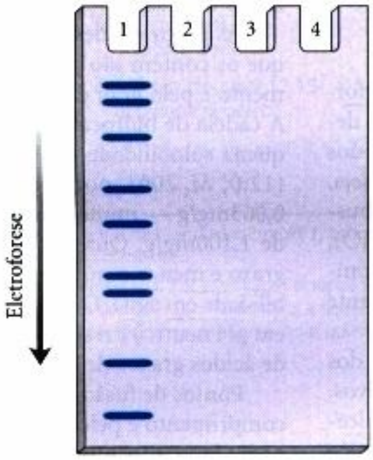
10. Seqüenciamento do DNA. O fragmento de DNA mostrado a seguir foi seqüenciado pelo método de Sanger. O asterisco em vermelho indica um marcador fluorescente.

*5′ —— 3′-OH
3′ —— ATTACGCAAGGACATTAGAC- - -5′

Uma amostra do DNA reagiu com a DNA polimerase e cada uma das misturas de nucleotídeos (num tampão apropriado) listadas abaixo. Didesoxinucleotídeos (ddNTPs) foram adicionados em quantidades relativamente pequenas.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

O DNA resultante foi separado por eletroforese em gel de agarose, e as bandas fluorescentes no gel foram localizadas. O padrão de bandas resultantes da mistura 1 de nucleotídeos é mostrado. Assumindo que todas as misturas corressem no mesmo gel, que aparência teriam as linhas restantes do gel?



11. Solubilidade dos componentes do DNA. Desenhe as seguintes estruturas e classifique suas solubilidades relativas na água (do mais para o menos solúvel): desoxirribose, guanina, fosfato. Como essas solubilidades são compatíveis com a estrutura tridimensional da dupla fita de DNA?

12. A fosfodiesterase do veneno de serpentes. Uma exonuclease é uma enzima que seqüencialmente cliva os nucleotídeos a partir da extremidade de uma fita de polinucleotídeo. A fosfodiesterase do veneno de serpentes, que hidrolisa nucleotídeos a partir da extremidade 3′ de algum oligonucleotídeo com um grupo 3′-hidroxila, cliva entre a 3′-hidroxila da ribose ou desoxirribose e o grupo fosforil do próximo nucleotídeo. Ela age em fita simples de DNA ou RNA e não possui especificidade de base. Essa enzima foi usada em experimentos de determinação de seqüência antes do desenvolvimento das técnicas modernas de seqüenciamento de ácidos nucléicos. Quais são os produtos da digestão parcial pela fosfodiesterase do veneno de serpentes de um oligonucleotídeo com a seqüência (5′)GCGCCAUUGC(3′)—OH?

13. Preservando o DNA nos endosporos bacterianos. Os endosporos bacterianos se formam quando o ambiente não conduz mais a um metabolismo celular ativo. A bactéria do solo *Bacillus subtilis*, por exemplo, começa o processo de esporulação quando um ou mais nutrientes são depletados. O produto final é uma estrutura pequena, metabolicamente dormente, que consegue sobreviver quase indefinidamente sem nenhum metabolismo detectável. Os esporos possuem mecanismos para prevenir o acúmulo de mutações potencialmente letais no seu DNA durante períodos de dormência que podem exceder 1.000 anos. Os esporos do *Bacillus subtilis* são muito mais resistentes do que as células de crescimento do organismo ao calor, à radiação UV e aos agentes oxidantes, todos os quais promovem mutações.

(a) Um fator que previne a lesão potencial do DNA nos esporos é o seu conteúdo de água grandemente diminuído. Como isso afetaria alguns tipos de mutação?

(b) Os endosporos possuem uma categoria de proteínas chamadas de proteínas ácido-solúveis pequenas (SASPs), que se ligam ao seu DNA, prevenindo a formação de dímeros do tipo ciclobutano. O que induz os dímeros de ciclobutano e por que os endosporos bacterianos necessitam de mecanismos para prevenir a sua formação?

Bioquímica na internet

14. A estrutura do DNA. A elucidação da estrutura tridimensional do DNA ajuda os pesquisadores a entender como essa molécula transporta a informação que pode ser replicada fielmente de uma geração para a próxima. Para ver a estrutura secundária da dupla fita de DNA, visite a página da Web que tem o "Protein Data Bank" (Banco de Dados de Proteína). Use os PDB de identificação listados abaixo para encontrar as páginas de dados para as duas formas de DNA. Abra essas estruturas usando Chimie e as diferentes opções para completar os exercícios seguintes.

(a) Obtenha o arquivo para a 141D, uma seqüência altamente conservada de uma região de repetição longa terminal do HIV-1. Exiba a molécula como uma estrutura de bastão ou bola-e-bastão. Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada fita do DNA dúplex. Localize e identifique as bases individuais. Qual é a extremidade 5′ dessa molécula? Localize o sulco principal e o secundário. Ela é uma hélice de mão esquerda ou direita?

(b) Obtenha o arquivo para a 145D, DNA na conformação Z. Exiba a molécula como uma estrutura de bastão ou bola-e-bastão. Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada fita do DNA dúplex. Ela é uma hélice de mão direita ou esquerda?

(c) Para apreciar totalmente a estrutura secundária do DNA ative a opção stereo no visor. Você verá duas imagens da molécula do DNA. Posicione seu nariz a aproximadamente 25cm do monitor e focalize a extremidade de seu nariz. No fundo você verá três imagens da hélice do DNA. Mude seu foco da extremidade do nariz para o meio da imagem, que deverá aparecer em três dimensões. Para outras dicas veja o Guia de Estudo ou http://www.worthpublishers.com/lehninger.

CAPÍTULO 11

Lipídios

Os lipídios biológicos constituem um grupo de compostos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, exibem, como característica definidora e comum, insolubilidade em água. As funções biológicas dos lipídios são tão diversas quanto a sua química. Em muitos organismos, gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia. Fosfolipídios e esteróis são os principais elementos estruturais de membranas biológicas. Outros lipídios, mesmo quando presentes em quantidades relativamente pequenas, têm papéis cruciais como co-fatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem radiações luminosas, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares. Este capítulo estuda os lipídios representativos de cada tipo, com ênfase na sua estrutura química e nas suas propriedades físicas.

Lipídios de Armazenamento

As gorduras e os óleos usados quase universalmente como formas de armazenamento de energia nos organismos vivos são derivados de **ácidos graxos**. Os ácidos graxos são derivados dos hidrocarbonetos, no mesmo baixo estado de oxidação (ou seja, tão altamente reduzidos) como os hidrocarbonetos em combustíveis fósseis. A oxidação celular de ácidos graxos (CO_2 e H_2O), da mesma maneira que a combustão controlada e rápida de combustíveis fósseis em motores de combustão interna, é altamente exergônica.

Introduziremos, a seguir, a estrutura e a nomenclatura dos ácidos graxos usualmente encontrados em organismos vivos. Dois tipos de compostos que contêm ácidos graxos, triacilgliceróis e ceras, são descritos para ilustrar a diversidade de estrutura e de propriedades físicas nessa família de compostos.

Os ácidos graxos são derivados dos hidrocarbonetos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento entre 4 e 36 carbonos (C_4 a C_{36}). Em alguns ácidos graxos, essa cadeia é totalmente saturada (não contém duplas ligações) e não-ramificada; em outros, a cadeia contém uma ou mais duplas ligações (Tabela 11-1). Alguns poucos contêm anéis de três carbonos, grupos hidroxila ou ramificações através do grupo metila. Uma nomenclatura simplificada para esses compostos especifica o comprimento da cadeia e o número de duplas ligações, separados por dois-pontos; o ácido palmítico, saturado e com 16 carbonos, é abreviado em 16:0, e o ácido oléico, com 18 carbonos e uma dupla ligação, em 18:1. As posições de quaisquer duplas ligações são especificadas por números superescritos a seguir da letra grega Δ (delta); um ácido graxo com 20 carbonos e uma dupla ligação entre C-9 e C-10 (C-1: o carbono carboxílico) e uma outra entre C-12 e C-13 é designado 20:2 ($\Delta^{9,12}$). Os ácidos graxos de ocorrência mais freqüente têm um número par de átomos de carbono em uma cadeia não-ramificada de 12 a 24 carbonos (Tabela 11-1). Como veremos no Capítulo 21, o número par de carbonos resulta da maneira como esses compostos são sintetizados, a qual envolve condensação de unidades de acetato (dois átomos de carbono).

A localização das duplas ligações também é regular; na maioria dos ácidos graxos monoinsaturados, a dupla ligação está entre C-9 e C-10 (Δ^9), e outras duplas ligações de ácidos graxos poliinsaturados são geralmente Δ^{12} e Δ^{15}. (Ácido araquidônico é uma exceção a essa generalização.) As duplas ligações dos ácidos graxos insaturados quase nunca são conjugadas (alternando ligações simples e duplas como em $-\mathrm{CH}{=}\mathrm{CH}-\mathrm{CH}{=}\mathrm{CH}-$), mas são separadas por um grupo metileno ($-\mathrm{CH}{=}\mathrm{CH}-\mathrm{CH_2}-\mathrm{CH}{=}\mathrm{CH}-$). Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem na natureza, as duplas ligações estão na configuração *cis*.

As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm são principalmente determinadas pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia de hidrocarboneto. A cadeia de hidrocarboneto não-polar é a responsável pela pequena solubilidade de ácidos graxos na água. O ácido láurico (12:0, M_r 200), por exemplo, tem solubilidade em água de 0,063mg/g — muito menor do que a da glicose (M_r 180), que é de 1.100mg/g. Quanto mais longa for a cadeia acila do ácido graxo e menor o número de duplas ligações, menor será a solubilidade em água. O grupo ácido carboxílico é polar (e ionizado em pH neutro) e responsável pela pequena solubilidade em água de ácidos graxos de cadeia curta.

Pontos de fusão também são fortemente influenciados pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada. Em temperatura ambiente (25°C), os ácidos graxos saturados de 12:0 a 24:0 têm consistência cerosa, enquanto os ácidos insaturados do mesmo comprimento são líquidos oleosos. Essas diferenças nos pontos de fusão são devidas a diferentes graus de empacotamento das moléculas de ácido graxo (Fig. 11-1). Nos compostos completamente saturados, a livre rotação em torno de cada ligação carbono-carbono proporciona grande flexibilidade à cadeia de hidrocarboneto; a conformação mais estável é a forma completamente estendida, na qual a interferência estérica dos átomos vizinhos é mínima. Essas moléculas podem se agrupar de forma compacta formando arranjos quase cristalinos, com os átomos ao longo de sua cadeia em contato de van der Waals com os átomos da cadeia vizinha. Nos ácidos graxos insaturados, uma dupla ligação em *cis* provoca curvatura na cadeia de hidrocarboneto. Ácidos graxos com uma ou mais dessas curvaturas não podem se agrupar de forma tão compacta como os ácidos graxos totalmente saturados, e as interações entre eles são conseqüentemente mais fracas. Como se gasta menos energia térmica para desfazer esses arranjos fracamente ordenados de ácidos graxos insaturados, estes possuem pontos de fusão consideravelmente mais baixos que os ácidos graxos saturados com o mesmo comprimento de cadeia (Tabela 11-1).

Tabela 11-1 – Alguns ácidos graxos de ocorrência natural

					Solubilidade a 30°C (mg/g solvente)	
Esqueleto carbônico	**Estrutura**[*]	**Nome sistemático**[†]	**Nome comum (derivação)**	**Ponto de fusão (°C)**	**Água**	**Benzeno**
12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Ácido *n*-dodecanóico	Ácido láurico (do latim, *laurus*, "árvore do louro")	44,2	0,063	2,600
14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Ácido *n*-tetradecanóico	Ácido mirístico (do latim, *Myristica*, gênero da noz moscada)	53,9	0,024	874
16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Ácido *n*-hexadecanóico	Ácido palmítico (do latim, *palma*, "palmeira")	63,1	0,0083	348
18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Ácido *n*-octadecanóico	Ácido esteárico (do grego, *stear*, "gordura dura")	69,6	0,0034	124
20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	Ácido *n*-eicosanóico	Ácido araquídico (do latim, *Arachis*, gênero dos legumes)	76,5		
24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	Ácido *n*-tetracosanóico	Ácido lignocérico (do latim, *lignum*, "madeira" + *cera*")	86,0		
$16{:}1(\Delta^9)$	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-hexadecenóico	Ácido palmitoléico	–0,5		
$18{:}1(\Delta^9)$	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-octadecenóico	Ácido oléico (do latim, *oleum*, "óleo")	13,4		
$18{:}2(\Delta^{9,12})$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-,*cis*-9,12-octadecadienóico	Ácido linoléico (do grego, *linon*, "linho")	–5		
$18{:}3(\Delta^{9,12,15})$	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-,*cis*-,*cis*-9,12,15-octadecatrienóico	Ácido α-linolênico	–11		
$20{:}4(\Delta^{5,8,11,14})$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	Ácido *cis*-,*cis*-,*cis*-,*cis*-5,8,11,14-icosatetraenóico	Ácido araquidônico	–49,5		

[*] Todos os ácidos têm suas fórmulas apresentadas na forma não-ionizada. Em pH 7, todos os ácidos graxos livres têm um carboxilato ionizado. Note que a numeração dos átomos de carbono se inicia no carbono carboxílico.

[†] O prefixo "*n*-" indica uma estrutura "normal", não-ramificada. Por exemplo, "dodecanóico" simplesmente indica 12 átomos de carbono, que poderiam ser dispostos em uma variedade de formas ramificadas; "*n*-dodecanóico" especifica a forma linear, não-ramificada. Para ácidos graxos insaturados, a configuração de cada dupla ligação está indicada; em ácidos graxos biológicos, a configuração é quase sempre *cis*.

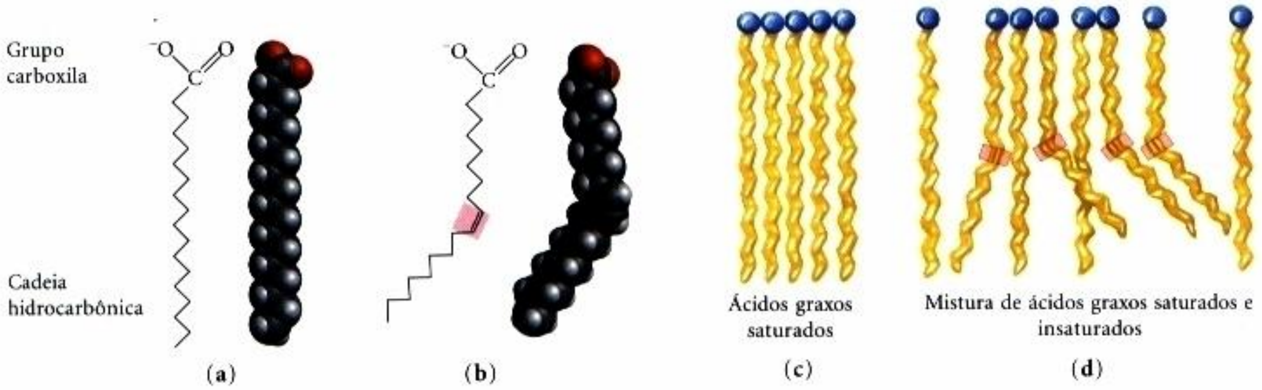


Figura 11-1 – Justaposição de ácidos graxos em agregados estáveis. A extensão do empacotamento depende do grau de saturação. (**a**) Duas representações de ácido esteárico completamente saturado (estearato em pH 7) na sua conformação usual estendida. Cada segmento de linha em ziguezague representa uma ligação simples entre carbonos adjacentes. (**b**) A dupla ligação *cis* (sombreada em vermelho) no ácido oléico (oleato) não permite rotação e introduz uma curvatura rígida na cadeia hidrocarbônica. Todas as outras ligações da cadeia são livres para girar. (**c**) Ácidos graxos totalmente saturados, na forma estendida, ajustam-se em arranjos quase cristalinos, estabilizados por muitas interações hidrofóbicas. (**d**) A presença de uma ou mais ligações *cis* interfere nesse empacotamento rígido e, como resultado, os agregados são menos estáveis.

Nos animais vertebrados, ácidos graxos livres (ácidos graxos não-esterificados tendo um grupo carboxilato livre) circulam no sangue ligados não-covalentemente a uma proteína carreadora, a soroalbumina. Entretanto, ácidos graxos do plasma sangüíneo estão presentes principalmente como derivados de ácidos carboxílicos, tais como ésteres ou amidas. Esses derivados de ácidos graxos não têm o grupo carboxilato carregado e, como conseqüência, são ainda menos solúveis em água que os ácidos graxos livres.

Os triacilgliceróis são ésteres de ácidos graxos do glicerol

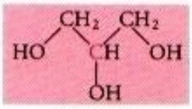
Os lipídios mais simples, construídos a partir de ácidos graxos, são os **triacilgliceróis**, também chamados triglicerídios, gorduras ou gorduras neutras. Triacilgliceróis são compostos de três ácidos graxos, cada um em ligação éster com o mesmo glicerol (Fig. 11-2). Aqueles contendo o mesmo tipo de ácido graxo em todas as três posições são classificados como triacilgliceróis simples e sua nomenclatura é derivada do ácido graxo que contêm. Triacilgliceróis simples de 16:0, 18:0 e 18:1, por exemplo, são triestearina, tripalmitina e trioleína, respectivamente. A maioria dos triacilgliceróis de ocorrência natural são mistos; eles contêm dois ou mais ácidos graxos diferentes. Para nomear esses compostos sem ambigüidade, o nome e a posição de cada ácido graxo devem ser especificados.

Como as hidroxilas polares do glicerol e os carboxilatos polares dos ácidos graxos estão unidos em ligações éster, os triacilgliceróis são moléculas hidrofóbicas, não-polares, essencialmente insolúveis em água. Lipídios têm uma densidade específica menor que a de água, o que explica por que em misturas de óleo e água (por exemplo, a mistura de óleo e vinagre para tempero de saladas) existem duas fases: óleo, com menor densidade específica, flutua sobre a fase aquosa.

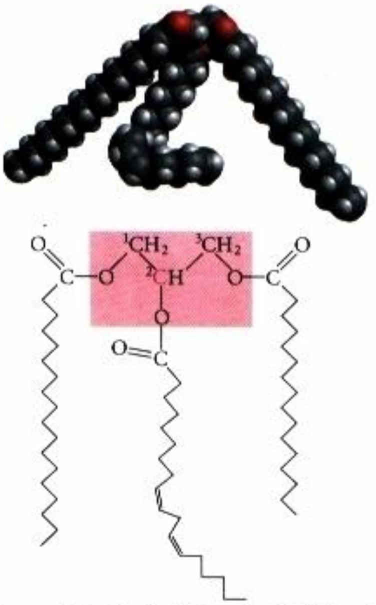
Os triacilgliceróis armazenam energia e fornecem insulação

Na maioria das células eucarióticas, os triacilgliceróis formam uma fase separada de gotículas microscópicas de óleo no citoplasma aquoso, servindo como depósitos de combustível metabólico (Fig. 11-3). Nos animais vertebrados, células especializadas, chamadas adipócitos, ou células gordurosas, armazenam grandes quantidades de triacilgliceróis como gotículas de gordura, as quais quase preenchem a célula. Triacilgliceróis também são armazenados como óleos nas sementes de muitos tipos de plantas, fornecendo energia e precursores biossintéticos durante a germinação das sementes (Fig. 11-3b). Adipócitos e sementes em germinação contêm **lipases**, enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis armazenados, liberando ácidos graxos para serem transportados a sítios onde são necessários como combustível.

Existem duas vantagens significativas em usar triacilgliceróis como combustível armazenado, em lugar de polissacarídeos como glicogênio e amido. Em primeiro lugar, como os átomos de carbono dos ácidos graxos estão mais reduzidos que os dos açúcares, sua oxidação fornece mais do que o dobro em energia, grama por grama, que a oxidação dos açúcares. Em segundo



Glicerol



1-estearoil, 2-linoleolil, 3-palmitoil glicerol, um triacilglicerol misto

Figura 11-2 – O glicerol e um triacilglicerol. O triacilglicerol misto aqui representado tem três diferentes ácidos graxos ligados à cadeia do glicerol. Quando o glicerol tem dois ácidos graxos diferentes em C-1 e C-3, o C-2 é um centro quiral (pag. 45).

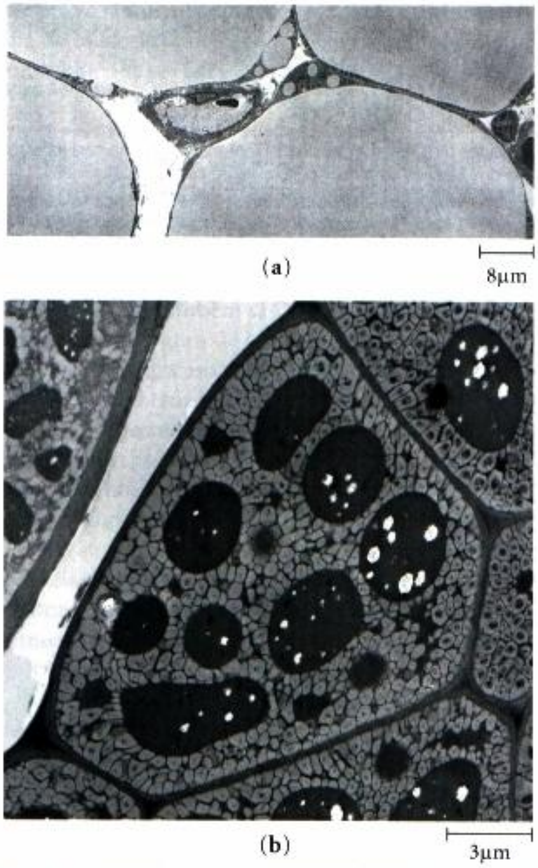


Figura 11-3 – Depósitos gordurosos nas células. (**a**) Secção de quatro adipócitos de cobaia, mostrando enormes gotículas de gordura que praticamente preenchem a célula. Também são visíveis vários capilares seccionados. (**b**) Secção de uma célula cotiledônea de uma semente da planta *Arabidopsis*. As estruturas grandes e escuras são corpos protéicos rodeados de óleo armazenado nos corpos oleosos claros.

lugar, como os triacilgliceróis são hidrofóbicos e, portanto, não-hidratados, o organismo que transporta gordura como combustível não deve suportar o peso extra da água de hidratação que está associada a polissacarídeos armazenados (2 gramas por grama de polissacarídeo). Nos seres humanos, o tecido adiposo é composto principalmente de adipócitos que se encontram sob a pele, na cavidade abdominal e nas glândulas mamárias. Pessoas moderadamente obesas, com 15 a 20kg de triacilgliceróis depositados em seus adipócitos, poderiam obter suas necessidades energéticas durante meses valendo-se de seus armazéns de energia. Em contraste, na forma de glicogênio, o corpo humano pode armazenar menos do que o suprimento energético necessário para um dia. Carboidratos, como glicose e glicogênio, oferecem certas vantagens como fonte rápida de energia metabólica, uma delas sendo sua imediata solubilidade em água.

Em alguns animais, triacilgliceróis armazenados sob a pele servem não só como reservas de energia, mas também como isolantes contra baixas temperaturas. Focas, leões-marinhos, pingüins e outros animais polares de sangue quente são amplamente acolchoados com triacilgliceróis. Em animais em hibernação (ursos, por exemplo), as enormes reservas de gordura acumuladas antes da hibernação servem a duplos propósitos: insulação e armazenamento de energia (veja **Adendo 17-1**, "Os ursos obesos realizam a β-oxidação durante seu período de hibernação"). A baixa densidade dos triacilgliceróis é a base de outra extraordinária função desses compostos. Nos cachalotes, o armazenamento de triacilgliceróis e de ceras permite aos animais ajustar a densidade de seus corpos àquela do meio ambiente, quando mergulham em águas frias profundas (Adendo 11-1).

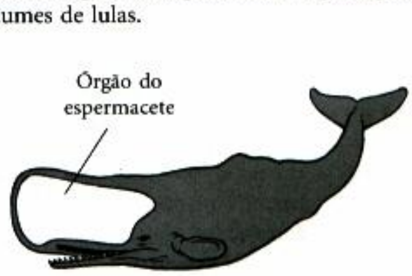
Muitos alimentos contêm triacilgliceróis

As gorduras naturais, tais como óleos vegetais, laticínios e gordura animal, são, na maioria, misturas complexas de triacilgliceróis simples e mistos. Estes contêm uma variedade de ácidos graxos que diferem no comprimento da cadeia e no grau de saturação (Fig. 11-4). Os óleos vegetais, como os óleos de milho (maís) e oliva, são compostos principalmente de triacilgliceróis com ácidos graxos insaturados e, portanto, são líquidos à temperatura ambiente. Eles são convertidos industrialmente em gorduras sólidas por hidrogenação catalítica, a qual reduz algumas de suas duplas ligações a ligações simples. Triacilgliceróis contendo somente ácidos graxos saturados, tais como a triestearina, o componente mais importante da gordura bovina, são sólidos brancos e gordurosos em temperatura ambiente.

Adendo 11-1 Os cachalotes: cabeças de sebo das profundezas

Estudos com as baleias do espermacete ou cachalotes esclareceram um outro processo que indica a utilidade biológica dos triacilgliceróis. A cabeça da baleia é muito grande, compreendendo mais ou menos um terço de seu peso corporal. Aproximadamente 90% do peso da cabeça se refere ao órgão do espermacete, uma massa esponjosa que contém aproximadamente 18.000kg (mais ou menos 4 toneladas) de óleo de espermacete, uma mistura de triacilgliceróis e ceras contendo uma abundância de ácidos graxos insaturados. Essa mistura é líquida na temperatura normal de repouso do corpo da baleia, aproximadamente 37°C, mas começa a se cristalizar ao redor de 31°C e se torna sólida quando esta temperatura diminui de vários graus.

A provável função biológica do óleo de espermacete foi deduzida a partir de pesquisa anatômica e de hábitos de alimentação do cachalote. Esses mamíferos se alimentam quase exclusivamente de lulas e em águas muito profundas. Em seus mergulhos alimentares, descem 1.000 metros ou mais; a maior profundidade registrada em mergulho foi de 3.000 metros (quase 2 milhas). Nessa profundidade, é escassa a competição para a abundante lula; o cachalote espera tranqüilamente a passagem dos cardumes de lulas.



Para que um animal marinho possa permanecer a uma dada profundidade sem constante esforço natatório, ele deve ter a mesma densidade que a água dos arredores. A baleia do espermacete sofre mudanças em sua flutuação para se ajustar à densidade do ambiente que a cerca — da superfície do oceano tropical para as grandes profundidades onde a água é muito mais fria e, portanto, mais densa. A chave é o ponto de fusão do óleo de espermacete. Quando a temperatura do óleo abaixa vários graus em um mergulho profundo, ele se congela ou cristaliza e se torna mais denso. Assim, a flutuação da baleia muda para se ajustar à densidade da água do mar. Vários mecanismos fisiológicos promovem o rápido resfriamento do óleo durante o mergulho. Durante o retorno à superfície, o óleo de espermacete congelado se aquece e funde, diminuindo sua densidade para se adequar à água da superfície. Assim, constatamos na baleia do espermacete uma notável adaptação anatômica e bioquímica. Os triacilgliceróis e as ceras sintetizados pelo cachalote contêm ácidos graxos com adequado número de carbonos na cadeia e grau de insaturação para dar ao óleo de espermacete o ponto de fusão adequado para os hábitos de mergulho do animal.

Infelizmente para a população do cachalote, óleo de espermacete foi há tempos considerado o melhor óleo para a iluminação e continua a ser comercialmente valioso como lubrificante. Vários séculos de caça intensiva a esse mamífero levaram a baleia do espermacete a participar da lista das espécies em perigo de extinção, permanecendo sua população mundial em torno de 500.000 animais.

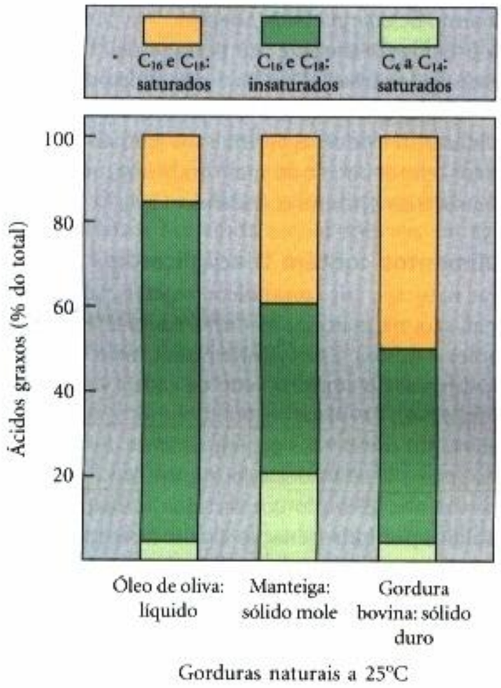


Figura 11-4 – Composição em ácidos graxos de três gorduras alimentares. Azeite de oliva, manteiga e gordura bovina consistem de misturas de triacilgliceróis, diferindo em sua composição de ácidos graxos. Os pontos de fusão dessas gorduras — e, portanto, seu estado físico em temperatura ambiente (25°C) — são uma função direta de sua composição em ácidos graxos. O óleo de oliva tem uma alta proporção de ácidos graxos insaturados de cadeia longa (C_{16} a C_{18}), o que justifica o seu estado líquido a 25°C. A maior proporção de ácidos graxos saturados de cadeia longa (C_{16} a C_{18}) na manteiga aumenta seu ponto de fusão: a manteiga é um sólido mole em temperatura ambiente. Gordura bovina, com uma proporção ainda maior de ácidos graxos saturados de cadeia longa, é um sólido duro.

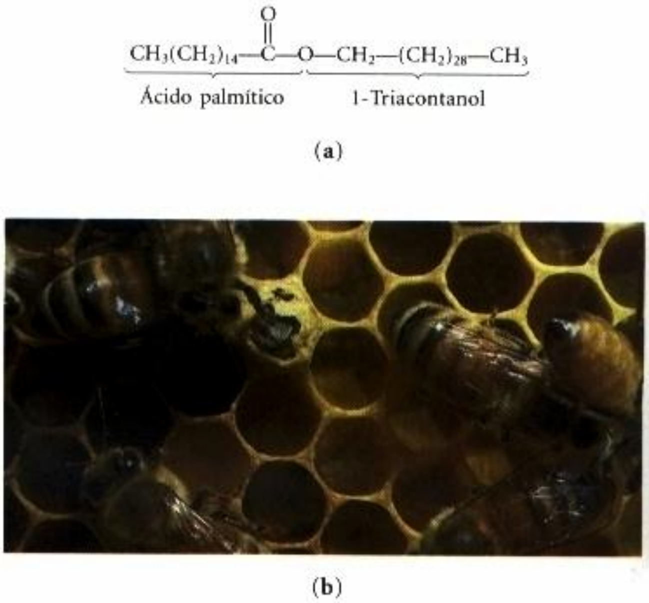

$CH_3(CH_2)_{14}—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—O—CH_2—(CH_2)_{28}—CH_3$
Ácido palmítico
1-Triacontanol
(a)
(b)

Figura 11-5 – Cera biológica. (**a**) Triacontanoilpalmitato, o principal componente da cera de abelha, é um éster de ácido palmítico com o álcool triacontanol. (**b**) Um favo de mel, construído de cera de abelha, é firme a 25°C e completamente impermeável à agua. O termo "wax" origina-se da palavra, em Inglês Antigo, *weax*, que significa "material do favo de mel".

Quando alimentos ricos em lipídios são expostos por longos períodos ao oxigênio do ar, eles podem se deteriorar e tornar rançosos. O gosto e o cheiro desagradáveis associados à rancificação resultam da clivagem oxidativa de duplas ligações em ácidos insaturados, produzindo aldeídos e ácidos carboxílicos de cadeia mais curta e, portanto, com maior volatilidade.

As ceras servem como armazéns de energia e como repelentes de água

Ceras biológicas são ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa (C_{14} a C_{36}), com álcoois de cadeia longa (C_{16} a C_{30}) (Fig. 11-5). Seus pontos de fusão (60 a 100°C) são geralmente mais altos do que os dos triacilgliceróis. No plâncton, constituído de microrganismos marinhos flutuando livremente e sendo o fundo da cadeia alimentar, as ceras são a principal forma de armazenamento de combustível metabólico.

As ceras também têm várias outras funções na natureza, em virtude de suas propriedades repelentes à água e de sua consistência firme. Certas glândulas da pele de vertebrados secretam ceras para proteger o pêlo e a pele e mantê-los flexíveis, lubrificados e à prova de água. Os pássaros, particularmente os pássaros marinhos, secretam ceras de suas glândulas do bico para manter suas penas repelentes à água. As folhas lustrosas de azevinhos, rododendros, marfim-venenoso e muitas outras plantas tropicais são cobertas por uma grossa camada de cera, que impede a evaporação excessiva da água e protege a planta contra parasitas.

As ceras biológicas encontram uma variedade de aplicações na indústria farmacêutica, de cosméticos e outras. Lanolina (da lã de carneiro), cera de abelha (Fig. 11-5), cera de carnaúba (uma palmeira brasileira) e a cera extraída do óleo de espermacete (de baleias; veja Adendo 11-1) são largamente usadas na manufatura de loções, pomadas e polidores.

Lipídios Estruturais em Membranas

A característica central na arquitetura de membranas biológicas é a camada dupla de lipídios, a qual age como uma barreira impedindo a passagem de moléculas polares e íons. Os lipídios da membrana são anfipáticos; um dos lados da molécula é hidrofóbico, o outro hidrofílico. Suas interações hidrofóbicas entre si e suas interações hidrofílicas com a água direcionam sua organização como bicamadas de membrana. Nos próximos tópicos descreveremos três tipos gerais de lipídios de membrana: glicerofosfolipídios, nos quais as regiões hidrofóbicas são compostas de dois ácidos graxos ligados a um glicerol; esfingolipídios, nos quais um único ácido graxo está ligado a uma amina graxa, esfingosina; e esteróis, compostos caracterizados por um sistema rígido de quatro anéis hidrocarbônicos fundidos. As regiões hidrofílicas nesses compostos anfipáticos podem ter a simplicidade de um único grupo —OH em uma das pontas do sistema de anéis dos esteróis, ou podem ser muito mais complexas. Nos glicerofosfolipídios e em alguns esfingolipídios, um grupo-cabeça polar está unido à porção hidrofóbica por uma ligação fos-

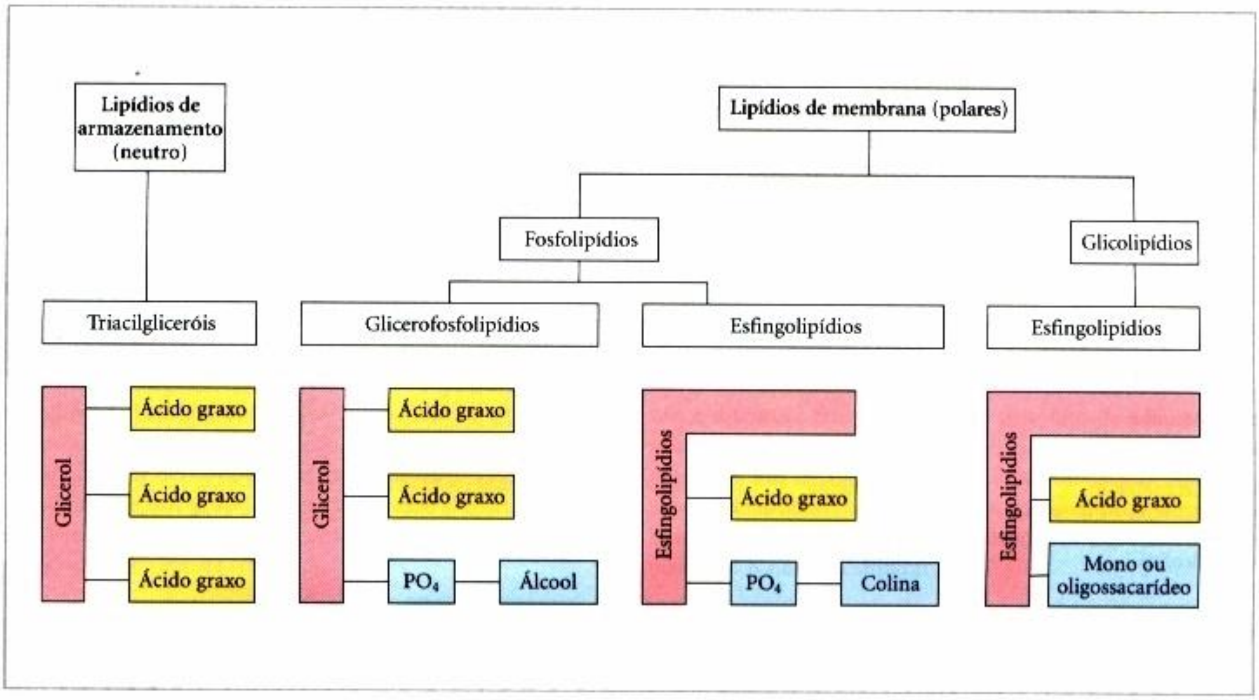
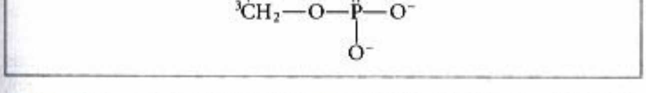


Figura 11-6 – As principais classes de lipídios de armazenamento e de membrana. Todos os lipídios aqui representados têm glicerol ou esfingosina como estrutura básica. Uma terceira classe de lipídios de membrana, os esteróis, será descrita depois (veja Fig. 11-14).

fodiéster; esses são os **fosfolipídios.** Outros esfingolipídios não têm fosfato, mas podem ter um açúcar simples ou um oligossacarídeo complexo na sua ponta polar; esses são os **glicolipídios** (Fig. 11-6). Nesses grupos de lipídios de membrana, a enorme diversidade resulta de várias combinações de "caudas" de ácidos graxos e "cabeças" polares. Os arranjos desses lipídios nas membranas e os papéis estruturais e funcionais que terão nelas serão discutidos no próximo capítulo.

Glicerofosfolipídios são derivados do ácido fosfatídico

Glicerofosfolipídios, também chamados fosfoglicerídios, são lipídios de membrana em que dois ácidos graxos estão unidos em ligação éster ao primeiro e ao segundo carbono do glicerol, e um grupo altamente polar ou carregado está ligado por meio de uma ligação fosfodiéster ao terceiro carbono. O glicerol é próquiral; ele não tem carbonos assimétricos, mas a ligação de fosfato a uma de suas pontas o converte em um composto quiral que pode ser corretamente chamado L-glicerol 3-fosfato ou D-glicerol 1-fosfato (Fig. 11-7). Glicerofosfolipídios são denominados como derivados do composto precursor ácido fosfatídico (Fig. 11-8), de acordo com o álcool polar no seu grupo-cabeça. Por exemplo, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina têm colina e etanolamina nos seus grupos-cabeça polares. Em todos esses compostos, o grupo-cabeça está ligado ao glicerol por um fosfodiéster, no qual o grupo fosfato tem uma carga negativa em pH neutro. O álcool polar pode estar negativamente carregado (como no fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), neutro (fosfatidilserina) ou positivamente carregado (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina). Como veremos no Capítulo 12, essas cargas têm uma contribuição significante nas propriedades de superfície das membranas.



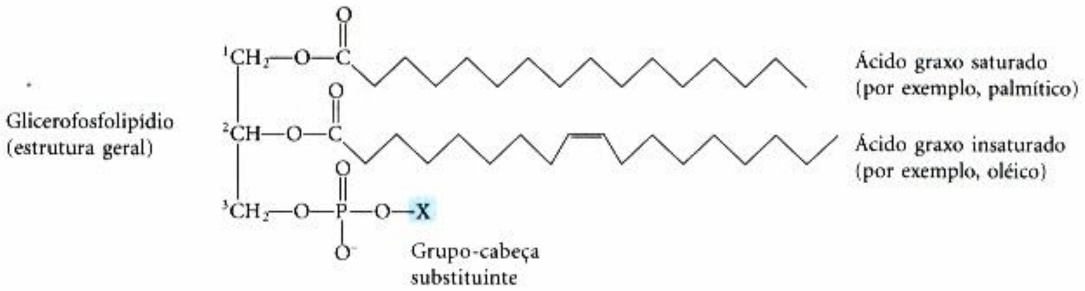
$$\begin{array}{l} \quad\ {}^{1}CH_2OH \\ H-{}^{2}C-OH \quad\ \ O \\ \quad\ {}^{3}CH_2-O-\overset{\|}{P}-O^- \\ \qquad\qquad\quad\ \ O^- \end{array}$$

Figura 11-7 – L-glicerol 3-fosfato, a estrutura básica de fosfolipídios. Note que este composto pode também ser chamado D-glicerol 1-fosfato.

Os ácidos graxos nos glicerofosfolipídios podem ser qualquer um de uma grande variedade, e assim um dado fosfolipídio (por exemplo, fosfatidilcolina) pode consistir de uma coleção de espécies moleculares, cada uma com seu complemento específico de ácidos graxos. A distribuição de espécies moleculares é característica para diferentes organismos, diferentes tecidos do mesmo organismo e diferentes glicerofosfolipídios na mesma célula ou tecido. De modo geral, glicerofosfolipídios contêm um ácido graxo saturado C_{16} ou C_{18} em C-1 e um insaturado C_{18} a C_{20} em C-2. Com poucas exceções, o significado biológico da variação de ácidos graxos e dos grupos-cabeça ainda não é bem compreendido.

Alguns fosfolipídios têm ácidos graxos unidos por ligação éter

Alguns tecidos de animais e organismos unicelulares são ricos em éteres de lipídios, nos quais uma das duas cadeias acílicas está ligada ao glicerol em ligação éter, em vez de éster. A cadeia ligada em éter pode ser saturada, como nos alquil-éter lipídios, ou pode conter uma dupla ligação entre C-1 e C-2, como nos **plasmalogênios** (Fig. 11-9). O tecido cardíaco de vertebrados é especialmente rico em éteres de lipídios; aproximadamente metade dos fosfolipídios do coração é plasmalogênio. As membranas de bactérias halofílicas, dos protistas ciliados e de certos invertebrados também contêm proporções altas de éteres de lipídios. O significado funcional dos éteres de lipídios nessas membranas é desconhecido; é possível que em algumas condições sua resistência às fosfolipases, que clivam ácidos graxos em


Glicerofosfolipídio
(estrutura geral)
¹CH₂—O—C
²CH—O—C
³CH₂—O—P—O—X
Ácido graxo saturado
(por exemplo, palmítico)
Ácido graxo insaturado
(por exemplo, oléico)
Grupo-cabeça
substituinte

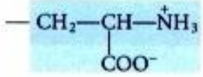
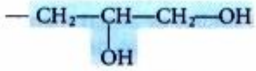
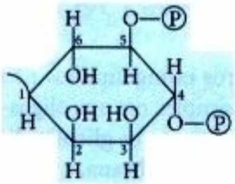
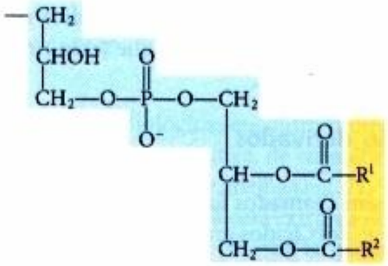
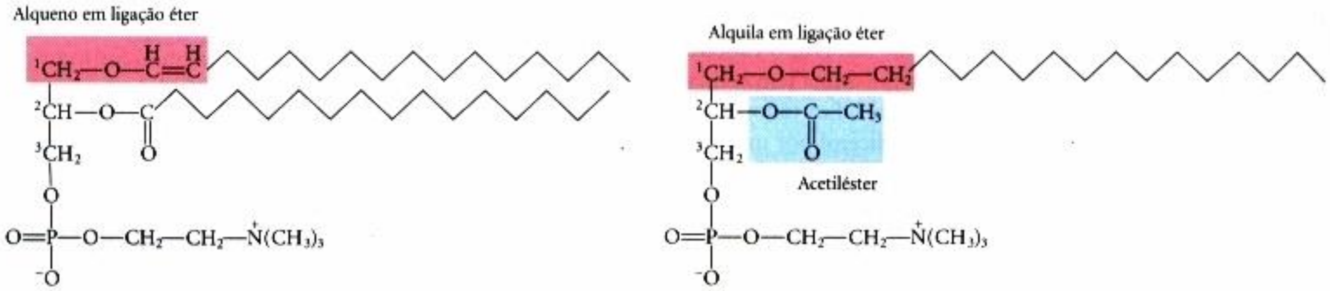
Nome do glicerofosfolipídio	Nome de X	Fórmula de X	Carga total (em pH 7)
Ácido fosfatídico	—	$-H$	–1
Fosfatidiletanolamina	Etanolamina	$-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_3$	0
Fosfatidilcolina	Colina	$-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	0
Fosfatidilserina	Serina	 $-CH_2-\underset{COO^-}{CH}-\overset{+}{N}H_3$	–1
Fosfatidilglicerol	Glicerol	 $-CH_2-\underset{OH}{CH}-CH_2-OH$	–1
Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato	*myo*-Inositol 4,5-bifosfato		–4
Cardiolipina	Fosfatidilglicerol		–2

Figura 11-8 – Glicerofosfolipídios. Os glicerofosfolipídios comuns são diacilgliceróis ligados a grupos-cabeça alcoólicos por meio de uma ligação fosfodiéster. O ácido fosfatídico, um fosfomonoéster, é o composto ancestral. A denominação de cada derivado contém o nome do grupo-cabeça-alcoólico (X) com o prefixo "fosfatidil-". Na cardiolipina, dois ácidos fosfatídicos compartilham um único glicerol.


Alqueno em ligação éter
Alquila em ligação éter
Acetiléster

Plasmalogênio

Fator ativador de plaquetas

Figura 11-9 – Éteres de lipídios. Plasmalogênios têm uma cadeia alquenil em ligação éter na qual a maioria dos glicerofosfolipídios tem um ácido graxo em ligação éster (compare com a Fig. 11-8). O fator de ativação de plaquetas tem uma longa cadeia alquílica ligada em éter no C-1 do glicerol, mas C-2 é ligado como éster ao ácido acético, o que faz o composto muito mais solúvel em água do que a maioria dos glicerofosfolipídios e plasmalogênios. O grupo-cabeça alcoólico é colina nos plasmalogênios e no fator ativador de plaquetas.

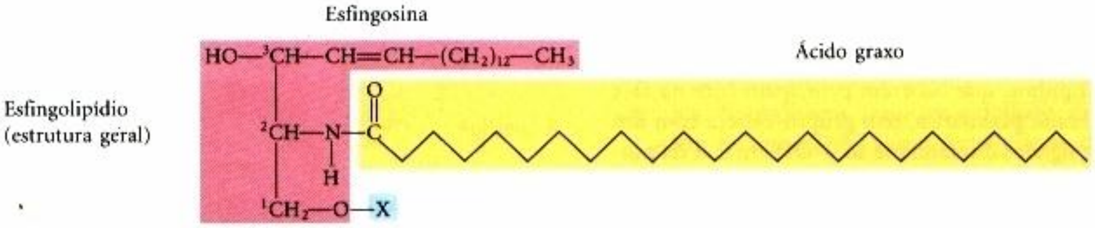
ligação éster de certos lipídios de membrana, seja um fato importante. Pelo menos um éter de lipídio, o **fator ativador de plaquetas**, é um potente sinal molecular. O fator é liberado de leucócitos, chamados basófilos, e estimula a agregação de plaquetas e a liberação de serotonina (um vasoconstritor) delas. Ele também exerce uma série de efeitos no fígado, músculo liso, coração, tecidos uterinos e pulmonares, e tem um papel importante na inflamação e na resposta alérgica.

Esfingolipídios são derivados da esfingosina

Esfingolipídios, a segunda maior classe de lipídios de membrana, têm também um grupo-cabeça polar e duas caudas não-polares, mas, em contraste com os glicerofosfolipídios, eles não contêm glicerol. Esfingolipídios são compostos de uma molécula do aminoálcool de cadeia longa, esfingosina (4-esfingenina), ou um de seus derivados, uma molécula de um ácido graxo de cadeia longa, e um grupo-cabeça polar que é acompanhado algumas vezes por uma ligação glicosídica e outras por uma ligação fosfodiéster (Fig. 11-10).

Os carbonos C-1, C-2 e C-3 da molécula da esfingosina são estruturalmente análogos aos três grupos hidroxila do glicerol em glicerofosfolipídios. Quando o ácido graxo está ligado como uma amida ao —NH_2 no C-2, o composto resultante é uma **ceramida**, que estruturalmente é similar a um diacilglicerol. Ceramida é o precursor estrutural de todos os esfingolipídios.

Existem três subclasses de esfingolipídios, todas derivadas da ceramida com diferentes grupos-cabeça: esfingomielinas, glicolipídios neutros (sem carga) e gangliosídios. **Esfingomielinas** contêm fosfocolina ou fosfoetanolamina com seu grupo-cabeça polar e são, portanto, classificadas junto com os glicerofosfolipídios como fosfolipídios (Fig. 11-6). Realmente, esfingomielinas se assemelham às fosfatidilcolinas em suas propriedades gerais e estrutura tridimensional, e pelo fato de não terem carga nos seus grupos-cabeça (Fig. 11-11). As esfingomielinas estão presentes nas membranas plasmáticas de células de animais e são especialmente importantes na mielina, uma lâmina membranosa que envolve e isola os axônios em alguns neurônios — portanto o nome "esfingomielina".



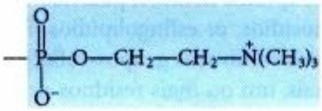
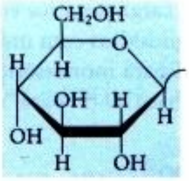
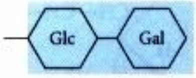
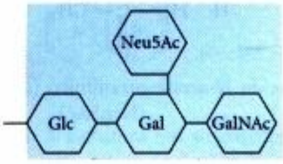
Nome do esfingolipídio	Nome de X	Fórmula de X
Ceramida	—	—H
Esfingomielina	Fosfocolina	 $-\overset{O}{\underset{O^-}{\overset{\Vert}{P}}}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$
Glicolipídios neutros Glicosilcerebrosídio	Glicose	
Lactosilceramida (um globosídio)	Di, tri, ou tetrassacarídeo	
Gangliosídio GM2	Oligossacarídeo complexo	

Figura 11-10 – Esfingolipídios. Os três primeiros carbonos da ponta polar da esfingosina são análogos aos três carbonos do glicerol nos glicerofosfolipídios. O grupo amino em C-2 têm um ácido graxo em ligação amida. Usualmente, o ácido graxo é saturado ou monoinsaturado, com 16, 18, 22 ou 24 átomos de carbono. Ceramida é o composto ancestral para esse grupo. Outros esfingolipídios diferem no grupo-cabeça polar (X) ligado em C-1. Gangliosídios têm grupos-cabeça oligossacarídicos muito complexos. Abreviações-padrão para açúcares são usadas nesta figura: Glc, D-glicose; Gal, D-galactose; GalNAc, *N*-acetil-D-galactosamina; Neu5Ac, ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico).

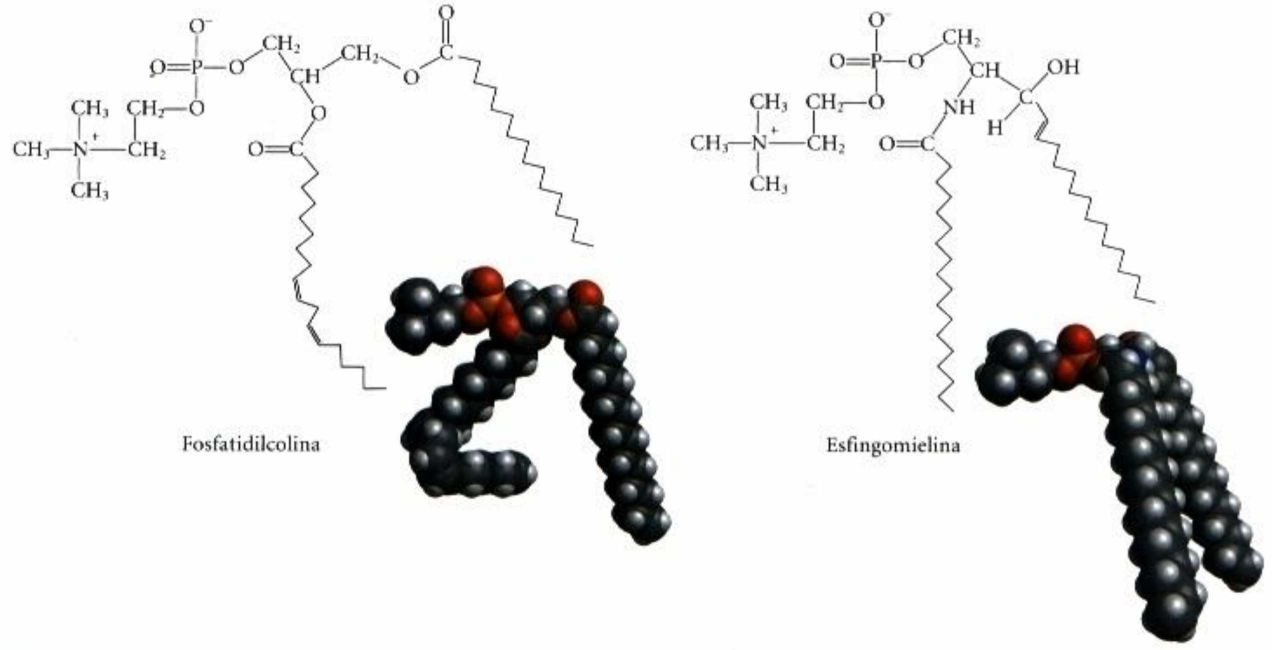
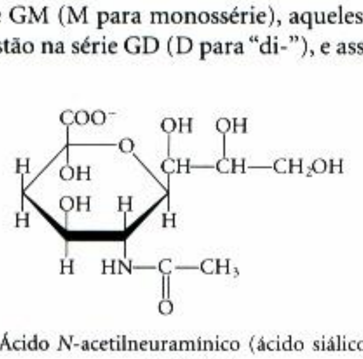


Figura 11-11 – As similaridades na forma e na estrutura molecular da fosfatidilcolina (um glicerofosfolipídio) e da esfingomielina (um esfingolipídio) ficam evidentes quando suas fórmulas estruturais e modelos espaciais são mostrados como nesta figura.

Glicoesfingolipídios, que ocorrem principalmente na face externa da membrana plasmática, têm grupos-cabeça com um ou mais açúcares, ligados diretamente ao —OH em C-1 da porção ceramida; eles não contêm fosfato. **Cerebrosídios** têm um único açúcar ligado à ceramida; aqueles com galactose são caracteristicamente encontrados na membrana plasmática de células em tecidos neurais; e aqueles com glicose, na membrana plasmática de células em tecidos não-neurais. **Globosídios** são glicoesfingolipídios neutros (sem carga) com dois ou mais açúcares, usualmente D-glicose, D-galactose ou *N*-acetil-D-galactosamina. Cerebrosídios e globosídios são às vezes também chamados **glicolipídios neutros**, pois não têm carga em pH 7.

Gangliosídios, os esfingolipídios mais complexos, têm oligossacarídeos como seus grupos-cabeça polares e, como unidades terminais, um ou mais resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), também chamado ácido siálico. O ácido siálico dá aos gangliosídios a carga negativa em pH 7, que os distingue dos globosídios. Gangliosídios com um resíduo de ácido siálico estão na série GM (M para monossérie), aqueles com dois ácidos siálicos estão na série GD (D para "di-"), e assim por diante.



Ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)
(Neu5Ac)

Johann Thudichum
(1829-1901)

Esfingolipídios na superfície celular são sítios de reconhecimento biológico

Quando os esfingolipídios foram descobertos há um século pelo médico-químico Johann Thudichum, suas funções biológicas eram tão enigmáticas como a Esfinge, pela qual ele os nomeou. No homem, foram identificados pelo menos 60 esfingolipídios nas membranas celulares. Muitos deles são especialmente importantes para as membranas plasmáticas de neurônios, e outros são indubitavelmente sítios de reconhecimento na superfície da célula, mas somente para poucos esfingolipídios se conhece uma função específica. As porções carboidrato de certos esfingolipídios definem os grupos sangüíneos humanos e, portanto, determinam o tipo de sangue que se pode receber com segurança em transfusões (Fig. 11-12). Os tipos e as quantidades de gangliosídios na membrana plasmática se modificam dramaticamente no desenvolvimento embrionário, e a formação de tumores induz a síntese de uma nova complementação de gangliosídios. Concentrações muito pequenas de um gangliosídio específico induzem diferenciação em células tumorais neuronais em cultura. Investigação sobre a função biológica de diversos gangliosídios é um terreno fértil para o futuro da pesquisa.

Fosfolipídios e esfingolipídios são degradados nos lisossomos

A maioria das células degrada e repõe continuamente os lipídios da membrana. Para cada ligação hidrolisável do glicerofosfolipídio existe uma enzima hidrolítica no lisossomo (Fig. 11-13). Fosfolipases do tipo A removem um dos dois ácidos graxos, produzindo um lisofosfolipídio. (Essas esterases não atacam a ligação éter dos plasmalogênios.) Lisofosfolipases removem o ácido graxo remanescente.

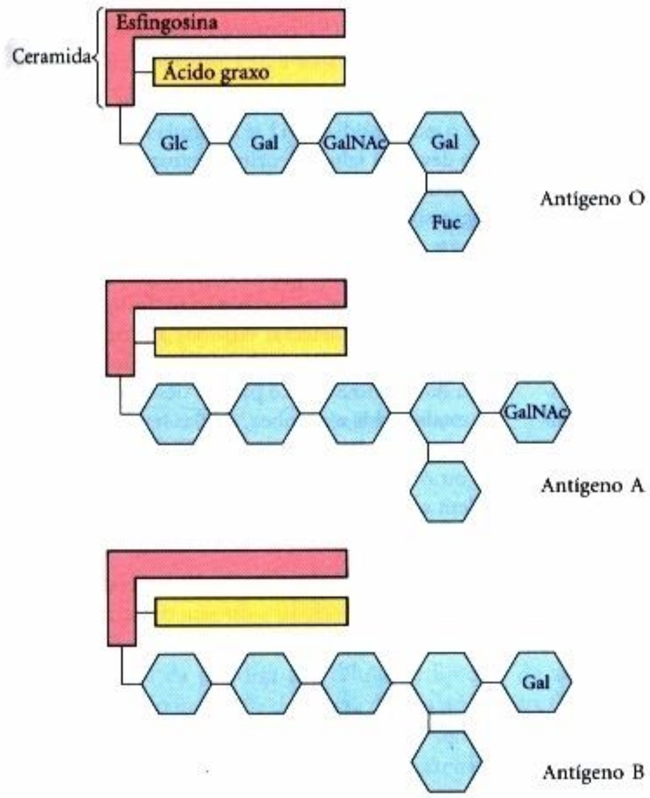


Figura 11-12 – Glicoesfingolipídios como determinantes de grupos sangüíneos. Os grupos sangüíneos humanos (O, A e B) são determinados em parte pelos grupos-cabeça oligossacarídicos (azul) destes glicoesfingolipídios. Os mesmos três oligossacarídeos são também encontrados ligados a certas proteínas do sangue de indivíduos de tipo sangüíneo O, A e B, respectivamente. (Fuc representa o açúcar fucose.)

Gangliosídios são degradados por um conjunto de enzimas lisossomais que catalisam a remoção gradual de unidades de açúcar, finalmente produzindo uma ceramida. Um defeito genético em qualquer uma dessas enzimas hidrolíticas leva a uma acumulação de gangliosídios na célula, com graves conseqüências médicas (Adendo 11-2).

Os esteróis possuem quatro anéis hidrocarbonados fundidos

Os **esteróis** são lipídios estruturais e estão presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas. Sua estrutura característica é o núcleo esteróide consistindo de quatro anéis fundidos, três com seis carbonos e um com cinco (Fig. 11-14). O núcleo esteróide é quase planar e relativamente rígido; os anéis fundidos não permitem rotação em torno das ligações C—C. **Colesterol**, o mais importante esterol dos tecidos animais, é anfipático, com um grupo-cabeça polar (o grupo hidroxila em C-3) e um corpo hidrocarbônico não-polar (o núcleo esteróide e uma cadeia lateral hidrocarbonada em C-17) de comprimento igual a um ácido graxo de 16 carbonos na sua forma estendida. Esteróis semelhantes são encontrados em outros eucariotos: por exemplo, estigmasterol em plantas e ergosterol em fungos. Bactérias não podem sintetizar esteróis; algumas espécies bacterianas, entretanto, podem incorporar esteróis exógenos em suas membranas. Os esteróis de todos os eucariotos são sintetizados de unidades simples de isopreno com cinco átomos de carbono, como o são as vitaminas lipossolúveis, quininas e dolicóis, descritos a seguir.

Além de seus papéis como constituintes de membrana, os esteróis servem como precursores de vários produtos com atividades biológicas específicas. Hormônios esteroidais, por exemplo, são potentes sinais biológicos que regulam a expressão gênica. Ácidos biliares são derivados polares do colesterol que agem como detergentes no intestino, emulsificando as gorduras da dieta para que se tornem mais acessíveis às lipases digestivas.

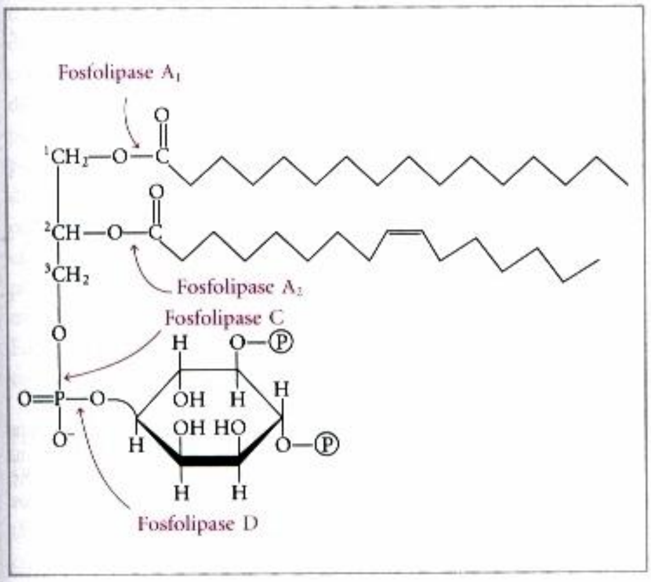


Figura 11-13 – As especificidades de fosfolipases. Fosfolipases A_1 e A_2 hidrolisam as ligações éster de glicerofosfolipídios intactos nos carbonos C-1 e C-2 do glicerol, respectivamente. As fosfolipases C e D quebram, cada uma delas, uma das ligações fosfodiéster no grupo-cabeça. Algumas fosfolipases agem somente em um tipo de glicerofosfolipídio, como o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (aqui representado) ou fosfatidilcolina; outras são menos específicas. Quando um dos ácidos graxos é removido por uma fosfolipase do tipo A, o segundo ácido graxo é clivado da molécula por uma lisofosfolipase (não mostrada).

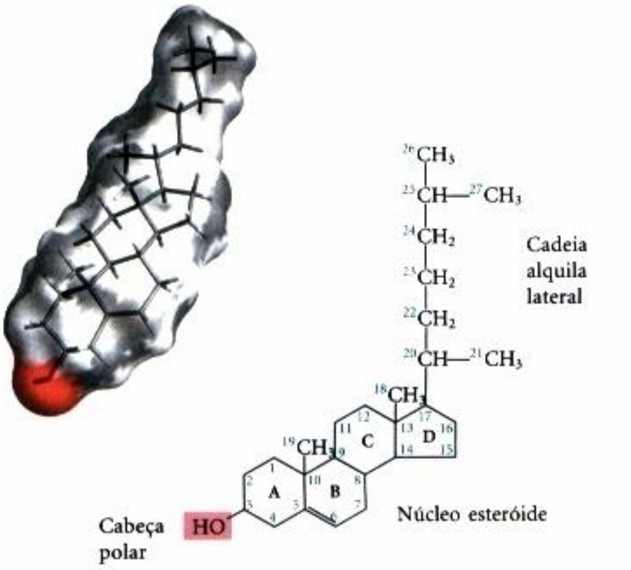


Figura 11-14 – Colesterol. A estrutura em segmentos do colesterol é visível através da superfície transparente contornando o modelo da molécula. Para simplificar a referência à estrutura química de derivados do núcleo esteróide, os anéis são denominados de A a D e os átomos de carbono numerados (em azul) como mostrado. O grupo hidroxila no C-3 representa o grupo-cabeça polar. Para armazenamento e transporte do esterol, esse grupo hidroxila se condensa com um ácido graxo para formar um éster de esterol.

Adendo 11-2 Algumas doenças humanas herdadas resultam do acúmulo anormal de lipídios de membrana

Os lipídios polares da membrana sofrem constante renovação metabólica, com a velocidade de sua síntese contrabalanceada pela sua degradação. A degradação dos lipídios é promovida por enzimas hidrolíticas nos lisossomos, cada enzima capaz de hidrolisar uma ligação específica. Quando a degradação de esfingolipídios é prejudicada por um defeito em uma dessas enzimas (Fig. 1), produtos de degradação parcial acumulam nos tecidos, causando graves doenças.

Por exemplo, a doença de Niemann-Pick é causada por um defeito genético raro na enzima esfingomielinase, que remove fosfocolina da esfingomielina. Esfingomielina acumula-se no cérebro, baço e fígado. A doença torna-se evidente em bebês e causa retardo mental e morte prematura.

Mais comum é a doença de Tay-Sachs (Fig. 2), na qual o gangliosídio GM2 se acumula no cérebro e no baço devido à falta da enzima hexosaminidase A. Os sintomas da doença de Tay-Sachs são retardamento progressivo no desenvolvimento, paralisia, cegueira e morte aos 3 ou 4 anos de idade.

Aconselhamento genético pode predizer e prevenir muitas doenças hereditárias. Testes em futuros pais podem detectar enzimas anormais, seguidos por testes de DNA que determinarão a natureza exata do defeito e o risco para os descendentes. Uma vez estabelecida a prenhez, células fetais obtidas em uma amostra de placenta (biópsia do *villus* coriônico) ou o fluido que envolve o feto (amniocentese) podem ser testados da mesma maneira.

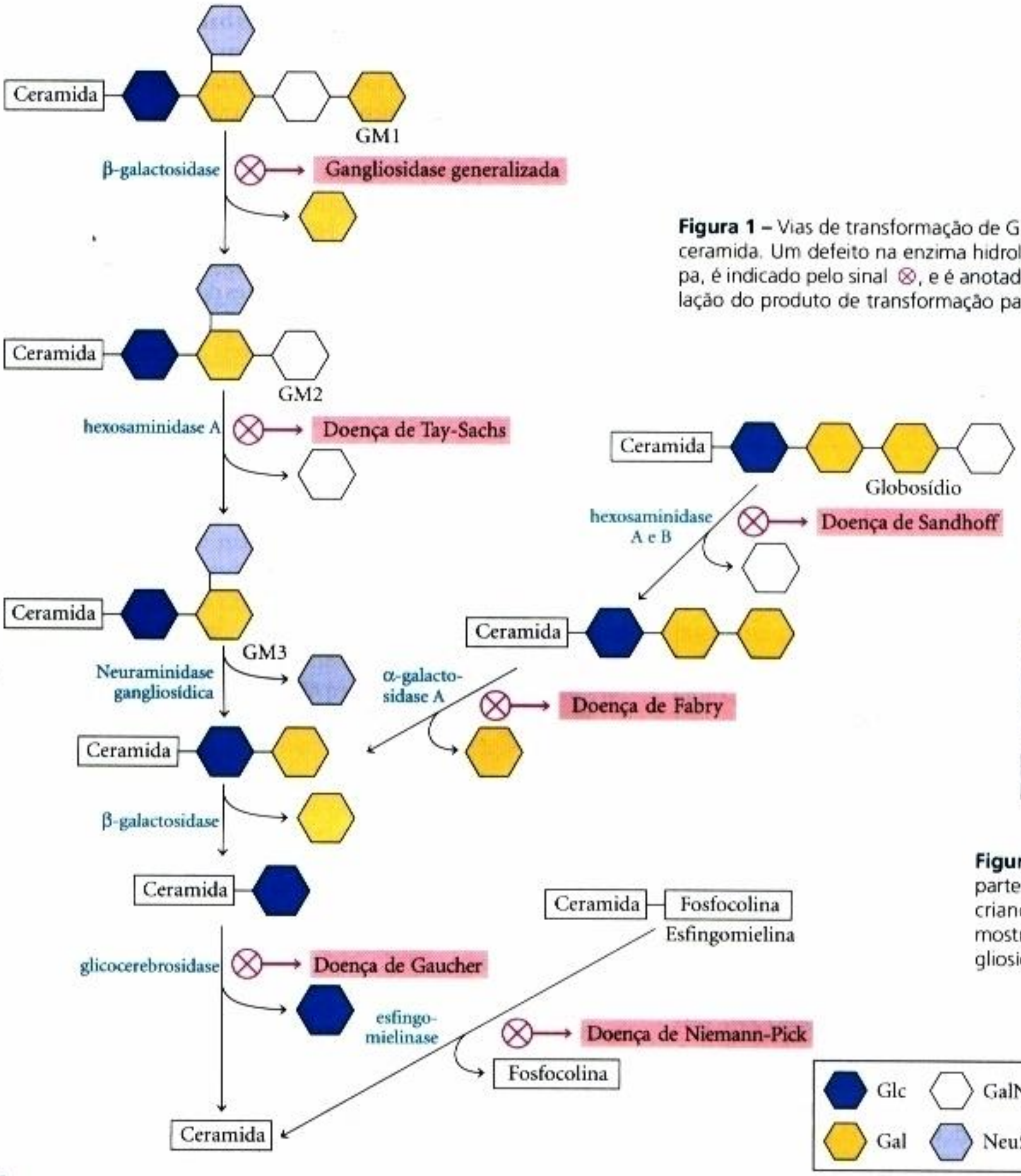

Ceramida
GM1
β-galactosidase
Gangliosidase generalizada
Ceramida
GM2
hexosaminidase A
Doença de Tay-Sachs
Ceramida
Globosídio
hexosaminidase A e B
Doença de Sandhoff
Ceramida
GM3
Neuraminidase gangliosídica
Ceramida
α-galactosidase A
Doença de Fabry
Ceramida
β-galactosidase
Ceramida
Ceramida
Fosfocolina
Esfingomielina
glicocerebrosidase
Doença de Gaucher
esfingomielinase
Doença de Niemann-Pick
Fosfocolina
Ceramida
Glc
GalNAc
Gal
Neu5Ac

Figura 1 – Vias de transformação de GM1, globosídio e esfingomielina à ceramida. Um defeito na enzima hidrolisante, em uma determinada etapa, é indicado pelo sinal ⊗, e é anotada a doença que resulta da acumulação do produto de transformação parcial.

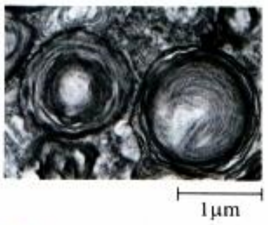
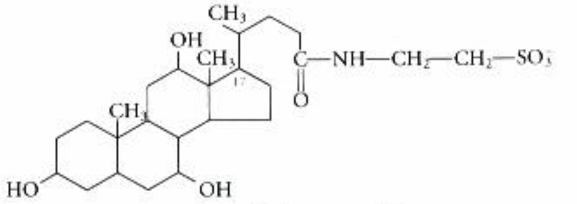


Figura 2 – Eletromicrografia de uma parte de uma célula cerebral de uma criança com a doença de Tay-Sachs, mostrando depósitos anormais de gangliosídios nos lisossomos.

Em capítulos seguintes voltaremos ao colesterol e outros esteróis, para considerar o papel estrutural do colesterol em membranas biológicas (Capítulo 12), a sinalização por hormônios esteroidais (Capítulo 13), a extraordinária via biossintética do colesterol e o seu transporte por carreadores lipoprotéicos (Capítulo 21).



Ácido taurocólico
(um ácido biliar)

Lipídios como Sinais, Co-fatores e Pigmentos

As duas classes de lipídios funcionais consideradas até agora (lipídios de armazenamento e lipídios estruturais) são componentes celulares majoritários; lipídios de membrana representam 5-10% da massa seca da maioria das células, e lipídios de armazenamento, mais do que 80% da massa de um adipócito. Com algumas exceções importantes, esses lipídios têm um papel *passivo* na célula; combustíveis lipídicos são armazenados até serem oxidados pelas enzimas, e lipídios de membrana formam barreiras impermeáveis que envolvem células e compartimentos celulares. Outro grupo de lipídios, presente em quantidades muito menores, tem papéis ativos no trânsito metabólico como metabólitos e mensageiros. Alguns servem como sinais potentes, como hormônios levados pelo sangue de um tecido a outro, ou como mensageiros intracelulares gerados como resposta a um sinal extracelular (hormônio ou fator de crescimento). Outros funcionam como co-fatores enzimáticos em reações de transferência de elétrons em cloroplastos e mitocôndrias, ou na transferência de grupamentos carboidrato em uma variedade de reações de glicosilação (adição de açúcar). Um terceiro grupo consiste de lipídios com um sistema de duplas ligações conjugadas: moléculas de pigmentos que absorvem luz visível. Alguns desses agem como pigmentos captores de luz na visão e na fotossíntese; outros produzem colorações naturais, como a cor de laranja das abóboras e cenouras e as cores amarelas das penas de canários. Lipídios especializados como estes são derivados dos lipídios da membrana plasmática ou das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K. Descreveremos sumariamente alguns desses lipídios biologicamente ativos. Em capítulos seguintes, sua síntese e seus papéis biológicos serão considerados com mais detalhes.

Fosfatidilinositóis agem como sinais intracelulares

Fosfatidilinositol e seus derivados fosforilados agem em diferentes níveis para regular a estrutura e o metabolismo celular (Fig. 11-15). Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (Fig. 11-8) no lado citosólico (interno) da membrana plasmática funciona como um sítio de ligação específico para certas proteínas do citoesqueleto e para algumas proteínas solúveis envolvidas em fusão de membranas durante a exocitose. O composto também serve como reservatório de moléculas mensageiras que são liberadas dentro da célula, em resposta a sinais extracelulares, interagindo com receptores específicos na superfície externa da membrana plasmática. Os sinais agem por meio de uma série de etapas (Fig. 11-15) que se inicia com a remoção enzimática de um grupo-cabeça fosfolipídico e termina com a ativação de uma enzima (proteína quinase C). Por exemplo, quando o hormônio vasopressina se liga a receptores da membrana plasmática de células epiteliais do ducto coletor renal, uma fosfolipase C específica é ativada. Fosfolipase C hidrolisa a ligação entre glicerol e fosfato no fosfoinositol 4,5-bifosfato liberando dois produtos: inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que é solúvel em água, e diacilglicerol, que permanece associado à membrana plasmática. IP_3 provoca a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, e a combinação de diacilglicerol e Ca^{2+} citosólico elevado ativa a enzima proteína quinase C. Essa enzima catalisa a transferência de um grupamento fosforil de ATP a um resíduo específico em uma ou mais proteínas-alvo, alterando assim sua atividade e o metabolismo da célula. Esfingolipídios de membrana também podem servir como fonte de mensageiros intracelulares; ambas, ceramida e esfingomielina (Fig. 11-10), são potentes reguladores de proteínas quinases.

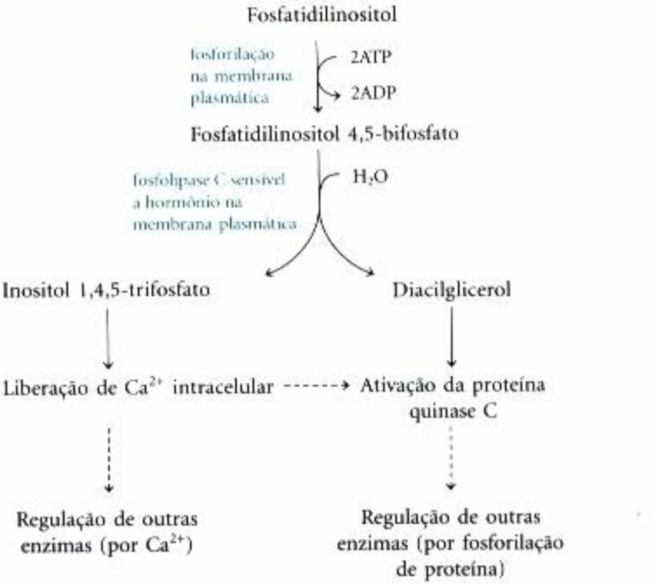

Fosfatidilinositol
fosforilação na membrana plasmática
2ATP
2ADP
Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
fosfolipase C sensível a hormônio na membrana plasmática
H2O
Inositol 1,4,5-trifosfato
Diacilglicerol
Liberação de Ca2+ intracelular
Ativação da proteína quinase C
Regulação de outras enzimas (por Ca2+)
Regulação de outras enzimas (por fosforilação de proteína)

Figura 11-15 – Fosfatidilinositóis na regulação celular. O fosfatidilinositol 4,5-bifosfato é hidrolisado na membrana plasmática por uma fosfolipase C específica, em resposta a sinais hormonais. Ambos os produtos da hidrólise agem como mensageiros intracelulares.

Os eicosanóides transportam mensagens às células vizinhas

Eicosanóides são hormônios parácrinos, substâncias que agem somente em células próximas ao local de síntese, em lugar de serem transportadas pelo sangue para agir sobre células em outros tecidos ou órgãos. Esses derivados de ácidos graxos têm uma variedade de efeitos dramáticos em tecidos de vertebrados. Sabe-se que estão envolvidos nas funções reprodutivas, na inflamação, na febre, na dor associada à injúria ou à doença, na secreção gástrica de ácido e em uma variedade de outros processos importantes na saúde e nas doenças dos seres humanos.

Todos eicosanóides são derivados do ácido poliinsaturado de 20 carbonos, ácido araquidônico, 20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$) (Fig. 11-16), do qual se deriva seu nome genérico (do grego *eikosi*, "vinte"). Existem três classes de eicosanóides: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.

As **prostaglandinas** (PG) contêm um anel de cinco carbonos originário da cadeia do ácido araquidônico. Seu nome é derivado da glândula prostática, tecido do qual elas foram inicialmente

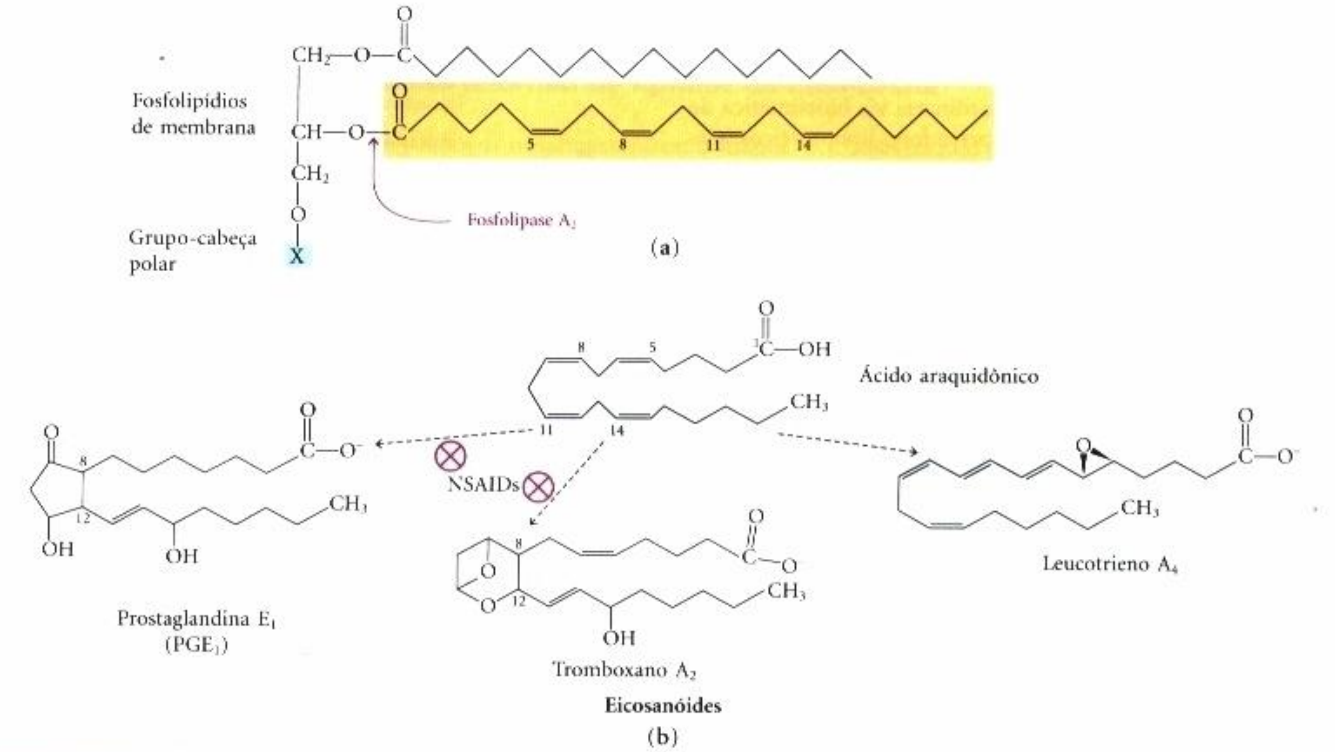


Figura 11-16 – Ácido araquidônico e alguns derivados eicosanóides. (**a**) Em resposta a sinais hormonais, fosfolipase A_2 cliva fosfolipídios de membrana contendo ácido araquidônico para liberar o ácido (araquidonato, em pH 7) que é o precursor de vários eicosanóides. (**b**) Estes incluem prostaglandinas como as PGE_1, nas quais C-8 e C-12 do araquidonato são ligados para formar o característico anel de cinco membros. No tromboxano A_2, o C-8 e o C-12 são ligados com a adição de um átomo de oxigênio formando um anel de seis membros. O leucotrieno A_4 tem uma série de três duplas ligações conjugadas. Compostos antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs), tais como aspirina, acetaminofeno e ibuprofeno, bloqueiam a formação de prostaglandinas e tromboxanos a partir de araquidonato inibindo a enzima cicloxigenase (prostaglandina H_2 sintase).

John Vane, Sune Bergström e Bengt Samuelsson

isoladas por Bengt Samuelsson e Sune Bergström. Dois grupos de prostaglandinas foram definidos originalmente: PGE, quando solúvel em éter, e PGF, quando solúvel em tampão fosfato (*fosfat*, em sueco). Cada grupo contém numerosos subtipos, chamados PGE_1, PGE_2, e assim por diante.

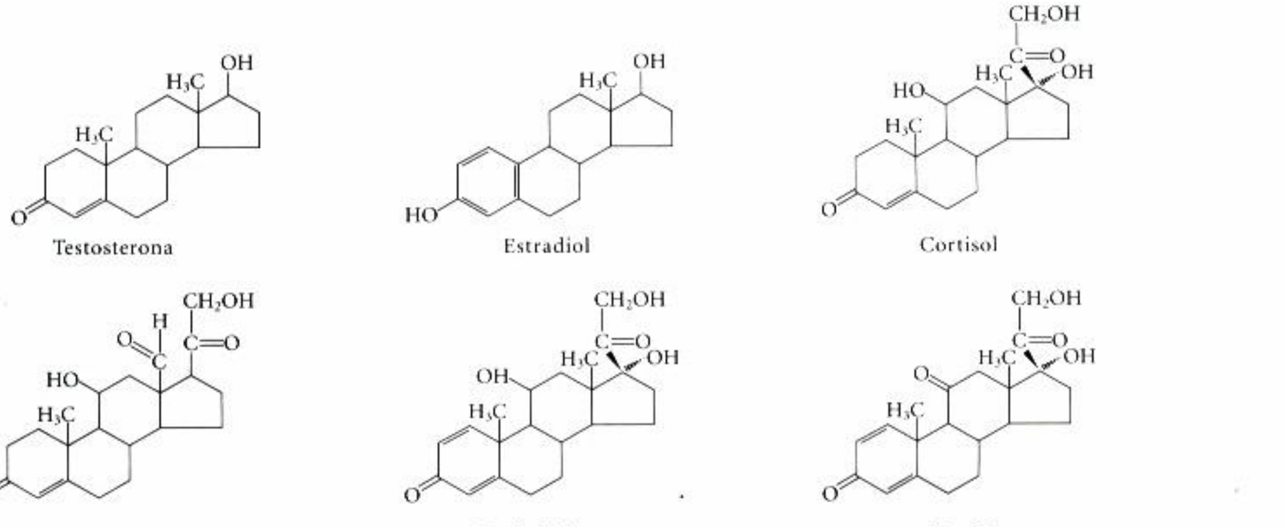
Prostaglandinas agem em muitos tecidos regulando a síntese da molécula mensageira intracelular 3′,5′-AMP cíclico (cAMP). Como cAMP é um mediador na ação de muitos hormônios, as prostaglandinas afetam um amplo espectro de funções celulares e tissulares. Algumas prostaglandinas estimulam contrações do músculo liso do útero durante a menstruação e o parto. Outras afetam o fluxo sangüíneo a órgãos específicos, o ciclo sono-vigília e as sensibilidades de certos tecidos a hormônios, tais como epinefrina e glucagon. Prostaglandinas, em um terceiro grupo, elevam a temperatura do corpo (produzindo febre) e causam inflamação e dor.

Os **tromboxanos**, isolados inicialmente de plaquetas sangüíneas (também chamados trombócitos), têm um anel de seis membros contendo um grupo éter. Eles são produzidos pelas plaquetas e agem na formação de coágulos sangüíneos e na redução do fluxo de sangue ao sítio do coágulo. O pesquisador John Vane mostrou que os compostos antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs) — aspirina, ibuprofeno acetaminofeno e meclofenato, por exemplo — inibem a enzima prostaglandina H_2 sintase (também chamada cicloxigenase ou COX), a qual catalisa uma etapa inicial na via araquidonato a prostaglandinas e tromboxanos (Fig. 11-16; veja também Adendo 21-2).

Os **leucotrienos**, encontrados inicialmente em leucócitos, contêm três duplas ligações conjugadas. Eles são poderosos sinais biológicos. Por exemplo, leucotrieno D_4 derivado de leucotrieno A_4 induz a contração do músculo que reveste as vias aéreas do pulmão. A superprodução de leucotrienos causa ataques asmáticos, e a síntese de leucotrienos é um dos alvos de drogas antiasmáticas, como a prednisona. A forte contração dos músculos lisos do pulmão que ocorre no choque anafilático é parte da reação potencialmente fatal em indivíduos hipersensíveis a picadas de abelhas, penicilina ou vários outros agentes.

Os hormônios esteróides transportam mensagens entre os tecidos

Esteróides são derivados oxidados dos esteróis; eles têm o núcleo esteróide, mas não têm a cadeia de alquila ligada ao anel D do colesterol, e são mais polares do que este. Hormônios esteróides são transportados pela corrente sangüínea por carreadores protéicos, do sítio de produção até os tecidos-alvo, aonde penetram nas células; no núcleo, ligam-se a proteínas receptoras altamente específicas e induzem modificações na expressão gênica e no me-



Testosterona Estradiol Cortisol

Aldosterona Prednisolona Prednisona

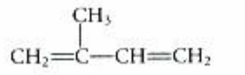
Figura 11-17 – Os esteróides derivados do colesterol. Testosterona, o hormônio sexual masculino, é produzido nos testículos. Estradiol, um dos hormônios sexuais femininos, é produzido nos ovários e na placenta. Cortisol e aldosterona são hormônios sintetizados no córtex da glândula supra-renal; eles regulam o metabolismo de glicose e a excreção salina, respectivamente. Prednisona e prednisolona são compostos esteroidais usados como agentes antiinflamatórios.

tabolismo. Os hormônios têm alta afinidade por seus receptores e, por essa razão, concentrações muito baixas (nanomolar ou menos) são suficientes para produzir respostas em tecidos-alvo.

Os principais grupos de hormônios esteróides são os hormônios sexuais masculinos e femininos e os hormônios produzidos pelo córtex da supra-renal, cortisol e aldosterona (Fig. 11-17). Prednisona e prednisolona são compostos esteróides com potentes atividades antiinflamatórias, mediadas em parte pela inibição da liberação de araquidonato pela fosfolipase A_2 (Fig. 11-16) e pela conseqüente inibição da síntese de leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos. Eles têm várias aplicações médicas, incluindo o tratamento de asma e artrite reumatóide.

Vitaminas A e D são precursores de hormônios

Durante o primeiro terço do século XX, uma grande área de pesquisa em química fisiológica foi a **identificação de vitaminas** — compostos essenciais à saúde do homem e de outros vertebrados, mas que não podem ser sintetizados por eles e, portanto, devem ser obtidos pela dieta. Os primeiros estudos nutricionais identificaram duas classes gerais desses compostos: aqueles solúveis em solventes orgânicos não-polares (vitaminas lipossolúveis) e aqueles que podiam ser extraídos dos alimentos com solventes aquosos (vitaminas hidrossolúveis). Eventualmente, o grupo lipossolúvel foi dividido em quatro grupos de vitaminas A, D, E e K, todos compostos isoprenóides sintetizados pela condensação de múltiplas unidades de isopreno. Destas, duas (D e A) servem como precursoras de hormônios.



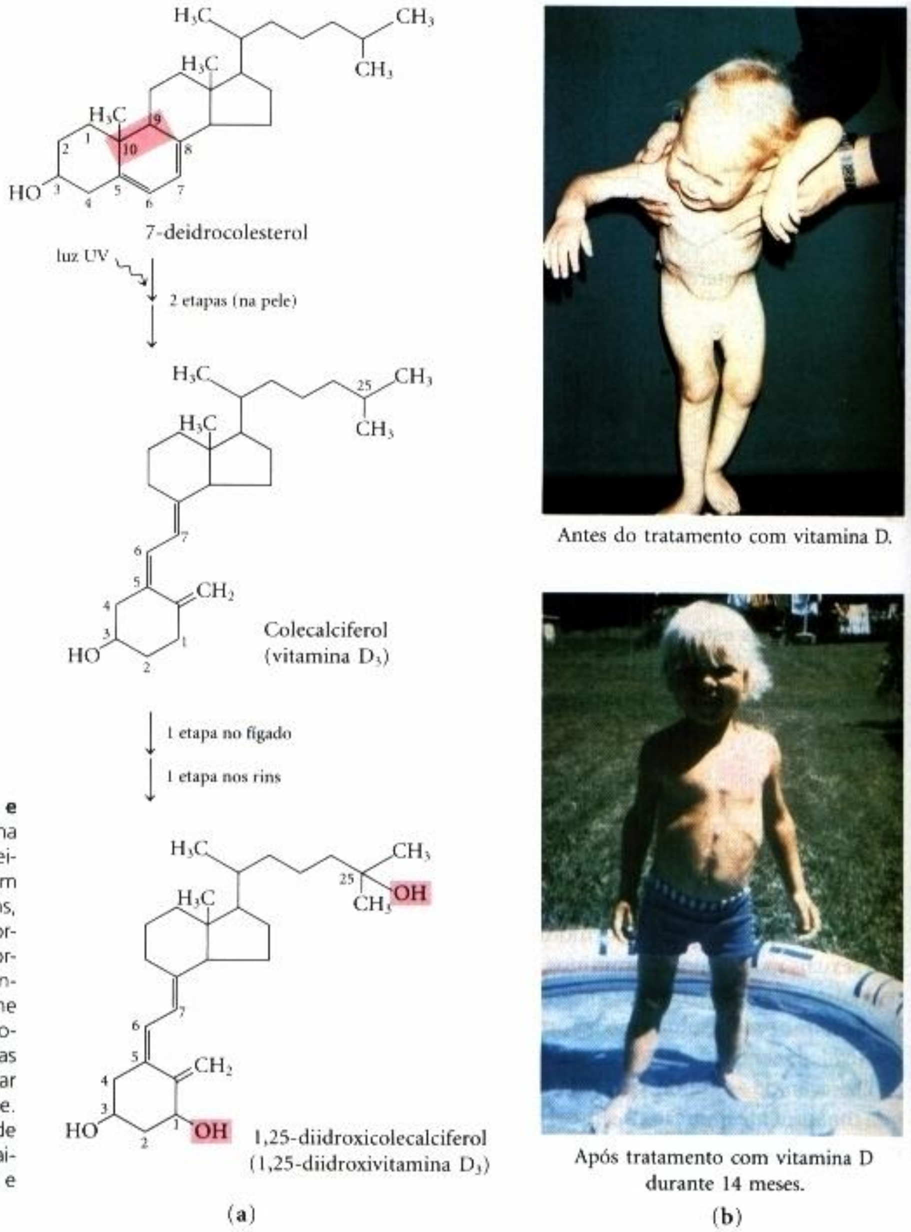
$$CH_2{=}\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}}{-}CH{=}CH_2$$

Isopreno

Vitamina D_3, também chamada **colecalciferol**, é normalmente formada na pele a partir de 7-deidrocolesterol em uma reação fotoquímica catalisada pelo componente UV da luz solar (Fig. 11-18). A vitamina D_3 não é ativa biologicamente, mas é convertida por enzimas do fígado e dos rins em 1,25-diidroxicolecalciferol, um hormônio que regula a absorção de cálcio no intestino e os níveis de cálcio nos rins e nos ossos. Deficiência de vitamina D leva à formação defeituosa dos ossos e ao raquitismo que é dramaticamente revertido pela administração da vitamina. Vitamina D_2 (ergocalciferol) é um produto comercial formado pela irradiação do ergosterol do levedo com luz ultravioleta. A vitamina D_2 é estruturalmente similar à D_3, com uma ligeira modificação na cadeia lateral ligada ao anel D do esterol. Ambas têm os mesmos efeitos biológicos, e a D_2 é usualmente adicionada ao leite e à manteiga como um suplemento dietário. Analogamente aos hormônios esteroidais, o produto do metabolismo da vitamina D, 1,25-diidroxicolecalciferol, regula a expressão gênica — por exemplo induzindo a síntese de uma proteína ligante de Ca^{2+} no intestino.

Vitamina A (**retinol**) em suas várias formas funciona como um hormônio e como o pigmento visual dos olhos dos vertebrados (Fig. 11-19). O derivado da vitamina A, ácido retinóico, atua por meio de proteínas dos receptores do núcleo celular, regulando a expressão gênica no desenvolvimento do tecido epitelial, incluindo a pele. Ácido retinóico é o ingrediente ativo no composto tretinoína (Retin-A) usado no tratamento de acne severo e pele enrugada. Retinal, o derivado da vitamina A, é o pigmento dos cones e bastonetes da retina que inicia a resposta à luz, produzindo um sinal neuronal ao cérebro. Esse papel do retinal está descrito em detalhe no Capítulo 13.

Vitamina A foi isolada inicialmente de óleos de fígado de peixe; fígado, ovos, leite integral e manteiga são boas fontes na dieta. Nos animais vertebrados, o β-caroteno, pigmento que dá a cor característica a cenoura, batata-doce e outros vegetais amarelos, pode ser convertido em vitamina A. A deficiência de vitamina A leva a uma variedade de sintomas no homem, incluindo secura da pele, olhos e membranas mucosas; desenvolvimento e crescimento retardados; cegueira noturna, um sintoma precoce usado no diagnóstico de deficiência de vitamina A.



Antes do tratamento com vitamina D.

Após tratamento com vitamina D durante 14 meses.

Figura 11-18 – A produção de vitamina D$_3$ e seu metabolismo. (**a**) O colecalciferol (vitamina D$_3$) é produzido na pele por irradiação de 7-deidrocolesterol com luz ultravioleta. No fígado, um grupo hidroxila é adicionado em C-25; nos rins, uma segunda hidroxilação em C-1 produz o hormônio ativo, 1,25-diidroxicolecalciferol. Esse hormônio regula o metabolismo de Ca^{2+} nos rins, intestino e ossos. (**b**) A vitamina D da dieta previne o raquitismo, uma doença que já foi muito comum nos países de clima frio, onde vestimentas pesadas bloqueiam o componente UV da luz solar necessário para a produção de vitamina D$_3$ na pele. À direita, em cima, a imagem de um menino de dois anos e meio com raquitismo severo; embaixo, o mesmo menino com cinco anos de idade e após 14 meses de terapia com vitamina D.

Vitaminas E e K e as quinonas lipídicas são co-fatores de oxidação e redução

Vitamina E é o nome coletivo para um grupo de lipídios intimamente relacionados, chamados **tocoferóis**, todos contendo um anel aromático substituído e uma longa cadeia lateral isoprenóide (Fig. 11-20a). Por serem hidrofóbicos, os tocoferóis associam-se à membrana celular, a depósitos lipídicos e a lipoproteínas do sangue. Tocoferóis são antioxidantes biológicos. O anel aromático reage com as formas mais reativas dos radicais de oxigênio e outros radicais livres e os destrói, protegendo os ácidos graxos insaturados e os lipídios da membrana contra a oxidação, impedindo assim danos oxidativos causadores de fragilidade celular. Tocoferóis são encontrados em ovos e óleos vegetais, e são especialmente abundantes no germe-de-trigo. Animais de laboratório alimentados com dieta sem vitamina E desenvolvem pele escamosa, fraqueza e atrofia muscular e esterilidade. Deficiência de vitamina E no homem é muito rara; o principal sintoma é a fragilidade dos eritrócitos.

O anel aromático da **vitamina K** (Fig. 11-20b) sofre um ciclo de oxidação e redução durante a formação de protrombina ativa, uma proteína do plasma sangüíneo essencial para a formação do coágulo do sangue. Protrombina é uma enzima proteolítica que quebra ligações peptídicas da proteína do sangue, fibrinogênio, para convertê-la em fibrina, a proteína fibrosa insolúvel que mantém a estrutura dos coágulos do sangue. Henrik Dam e Edward A. Doisy, independentemente, descobriram que a deficiência de vitamina K retarda a coagulação do sangue, o que pode ser fatal. Deficiência de vitamina K não é comum no homem, com exceção de um pequeno número de lactentes que sofrem da doença hemorrágica do recém-nascido, um defeito potencialmente fatal. Nos Estados Unidos, recém-nascidos recebem rotineiramente uma injeção de 1mg de vitamina K. Vitamina K$_1$ (filoquinina) é encontrada em folhas de plantas verdes; uma forma relacionada, vitamina K$_2$ (menaquinona), é formada por bactérias do intestino de vertebrados.

Warfarina (Fig. 11-20c) é um composto sintético que inibe a formação de protrombina ativa. É uma substância especialmente venenosa para ratos, causando morte por hemorragia interna. Ironicamente esse potente rodenticida é também um valioso composto anticoagulante para o tratamento de coagulação excessiva do homem, tais como pacientes cirúrgicos ou vítimas de trombose coronária.

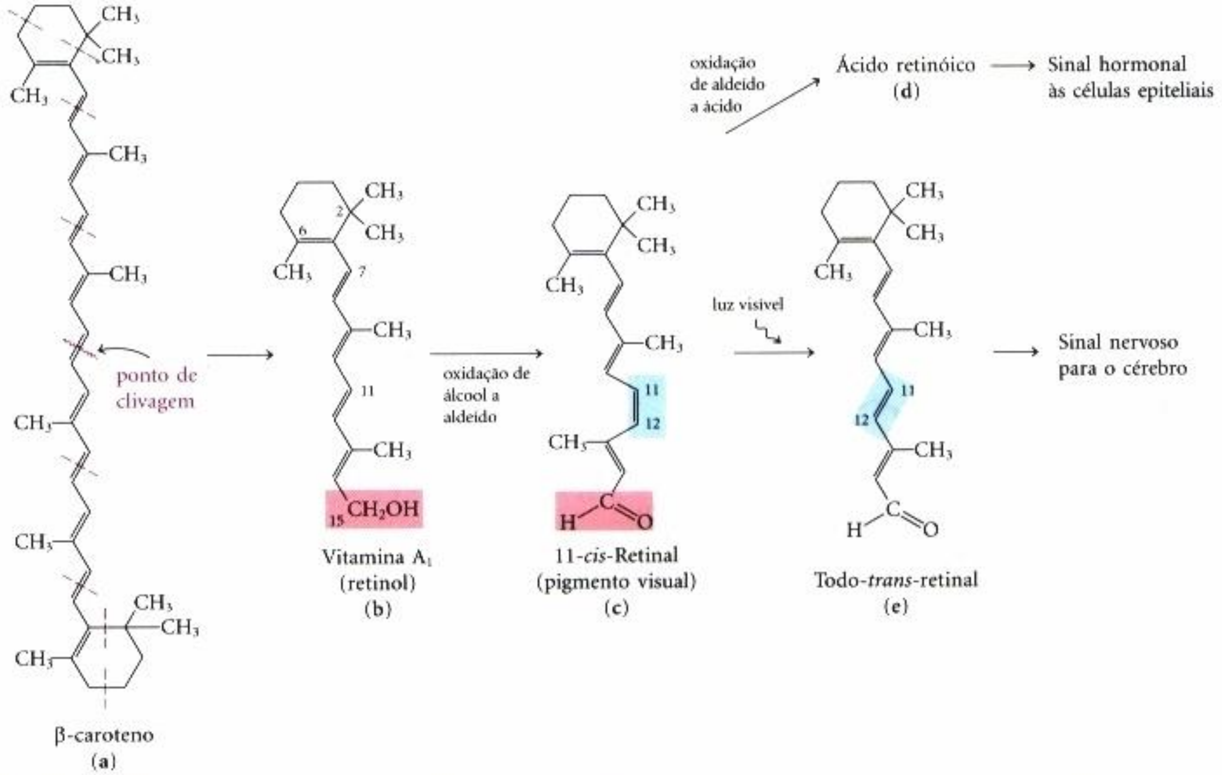


Figura 11-19 – Vitamina A_1, seu precursor e derivados. (**a**) O β-caroteno é o precursor da vitamina A_1. Unidades estruturais de isopreno estão indicadas por linhas tracejadas vermelhas. A clivagem do β-caroteno fornece duas moléculas de vitamina A_1 (retinol) (**b**). Oxidação em C-15 converte o retinol no aldeído, retinal (**c**), e nova oxidação produz ácido retinóico (**d**), um hormônio que regula a expressão gênica na pele. O retinal combina-se com a proteína opsina para formar rodopsina (não mostrada), um pigmento visual largamente empregado na natureza. Em ausência de luz, o retinal da rodopsina está na forma 11-*cis* (**c**). Quando a molécula de rodopsina é excitada por luz visível, o 11-*cis*-retinal sofre uma série de reações fotoquímicas que o convertem em todo-*trans*-retinal (**e**), forçando uma modificação na forma global da molécula de rodopsina. Essa transformação nas células em bastonetes da retina de vertebrados envia um sinal elétrico ao cérebro que é a base da transdução visual, um tópico que trataremos com mais detalhe no Capítulo 13.

Edward A. Doisy
(1893-1986)

Henrik Dam
(1895-1976)

Ubiquinona (também chamada coenzima Q) e plastoquinona (Fig. 11-20d, e) são isoprenóides que funcionam como transportadores lipofílicos de elétrons em reações de oxidação e redução que produzem ATP nas mitocôndrias e cloroplastos, respectivamente. Tanto a ubiquinona como a plastoquinona podem receber um ou dois elétrons ou um ou dois prótons como mostra a Figura 19-2.

Os dolicóis ativam açúcares precursores para a biossíntese

Durante a construção de carboidratos complexos nas paredes de células bacterianas, e durante a adição de unidades de polissacarídeos a certas proteínas (glicoproteínas) e lipídios (glicolipídios) em eucariotos, as unidades de açúcar a serem adicionadas são quimicamente ativadas pela ligação a álcoois isoprenóides chamados **dolicóis** (Fig. 11-20f). Esses compostos têm fortes interações hidrofóbicas com lipídios de membrana, ancorando os açúcares ligados à membrana na qual eles participam de reações de transferência de açúcares.

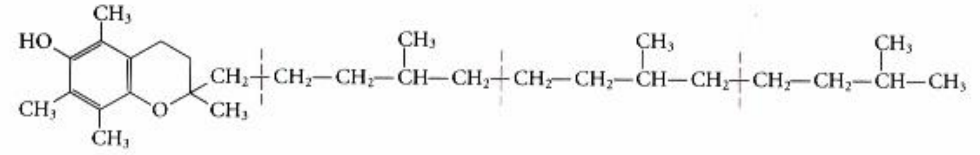
Separação e Análise de Lipídios

No estudo do papel biológico de lipídios em células e tecidos, é útil conhecer quais lipídios estão presentes e em quais proporções. Por serem insolúveis em água, lipídios devem ser extraídos e em seguida fracionados, pelo uso de solventes orgânicos e de algumas técnicas não usuais na purificação de moléculas solúveis em água, como as proteínas e os carboidratos. De modo geral, misturas complexas de lipídios são separadas por diferenças de polaridade ou solubilidade dos componentes em solventes não-polares. Lipídios que contêm ácidos graxos ligados como ésteres ou amidas podem ser hidrolisados por tratamento com ácido ou alcali ou com enzimas hidrolíticas altamente específicas (fosfolipases, glicosidases), fornecendo assim suas partes componentes para a análise. Alguns métodos de uso comum em análise de lipídios são mostrados na Figura 11-21 e discutidos a seguir.

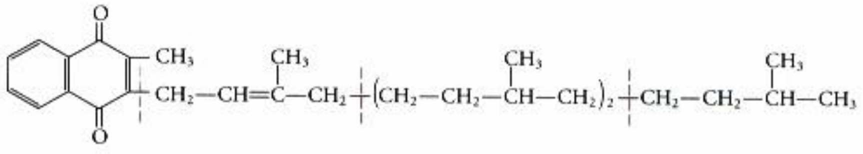
A extração de lipídios requer solventes orgânicos

Os lipídios neutros (triacilgliceróis, ceras, pigmentos etc.) são facilmente extraídos de tecidos com éter etílico, clorofórmio ou benzeno, solventes nos quais a agregação de lipídios não ocorre

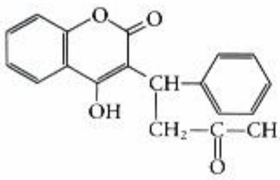
(a)
Vitamina E: um antioxidante



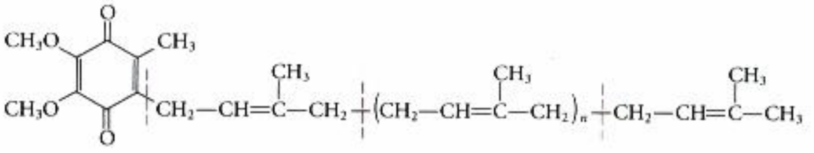
(b)
Vitamina K₁: um co-fator da coagulação do sangue (filoquinona)



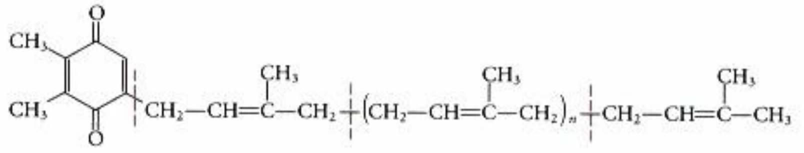
(c)
Warfarina: um anticoagulante sangüíneo



(d)
Ubiquinona: uma transportadora mitocondrial de elétrons (coenzima Q) (n = 4-8)



(e)
Plastoquinona: um transportador de elétrons do cloroplasto (n = 4-8)



(f)
Dolicol: um transportador de açúcar (n = 9-22)

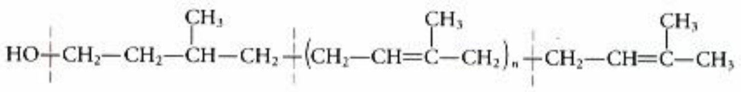


Figura 11-20 – Alguns outros isoprenóides ou derivados biologicamente ativos. Unidades estruturais de isopreno estão indicadas por linhas tracejadas vermelhas. Na maioria dos tecidos de mamíferos, ubiquinona (também chamada coenzima Q) tem dez unidades de isopreno. Dolicóis de animais têm de 17 a 21 unidades de isopreno (85 a 105 átomos de carbono), dolicóis bacterianos têm 11, e os de plantas e fungos têm de 14 a 24 unidades.

devido a interações hidrofóbicas. Os lipídios de membrana são extraídos mais eficientemente por solventes orgânicos mais polares, como etanol ou metanol, que reduzem as interações hidrofóbicas entre as moléculas de lipídios, além de enfraquecerem as pontes de hidrogênio e as interações eletrostáticas que ligam lipídios e proteínas em membranas. Um extrator freqüentemente usado é a mistura de clorofórmio, metanol e água, inicialmente nas proporções (1:2:0,8) que são miscíveis, produzindo uma única fase. Após a homogeneização do tecido nesse solvente para extrair todos os lipídios, mais água é adicionada ao extrato resultante e a mistura se separa, então, em duas fases, metanol/água (fase superior) e clorofórmio (fase inferior). Os lipídios permanecem na camada de clorofórmio, e moléculas mais polares como proteínas e açúcares, na partição, ficam na camada metanol/água.

Cromatografia de adsorção separa lipídios de polaridades diferentes

A complexa mistura de lipídios de tecidos pode ser fracionada ainda mais por procedimentos cromatográficos, baseados na diferença de polaridade de cada classe de lipídios. Em cromatografia de adsorção, um material polar, insolúvel, como sílica-gel (uma forma de ácido silícico, $Si(OH)_4$), é colocado em coluna de vidro e a mistura de lipídios (em solução de clorofórmio) é aplicada no topo da coluna. (Em cromatografia de alta eficiência, a coluna tem um diâmetro menor e os solventes atravessam a coluna sob alta pressão.) Os lipídios polares ligam-se fortemente ao ácido silícico polar, mas os lipídios neutros passam diretamente pela coluna e emergem nos primeiros eluatos de clorofórmio (Fig. 11-21b). Os lipídios polares são então eluidos, em ordem de polaridade crescente, com os solventes de polaridade progressivamente maior. Lipídios polares, não-carregados (cerebrosídios, por exemplo), são eluidos com acetona, e lipídios muito polares ou carregados (como os glicerofosfolipídios) são eluidos com metanol.

Cromatografia em camada delgada de ácido silícico emprega o mesmo princípio. Uma camada fina de sílica-gel é espalhada em uma placa de vidro, na qual ela se adere. Uma pequena amostra de lipídios dissolvidos em clorofórmio é aplicada próximo a uma das arestas da placa, a qual é imersa em um recipiente raso contendo um solvente orgânico ou mistura de solventes — o conjunto é colocado em uma câmara satura-

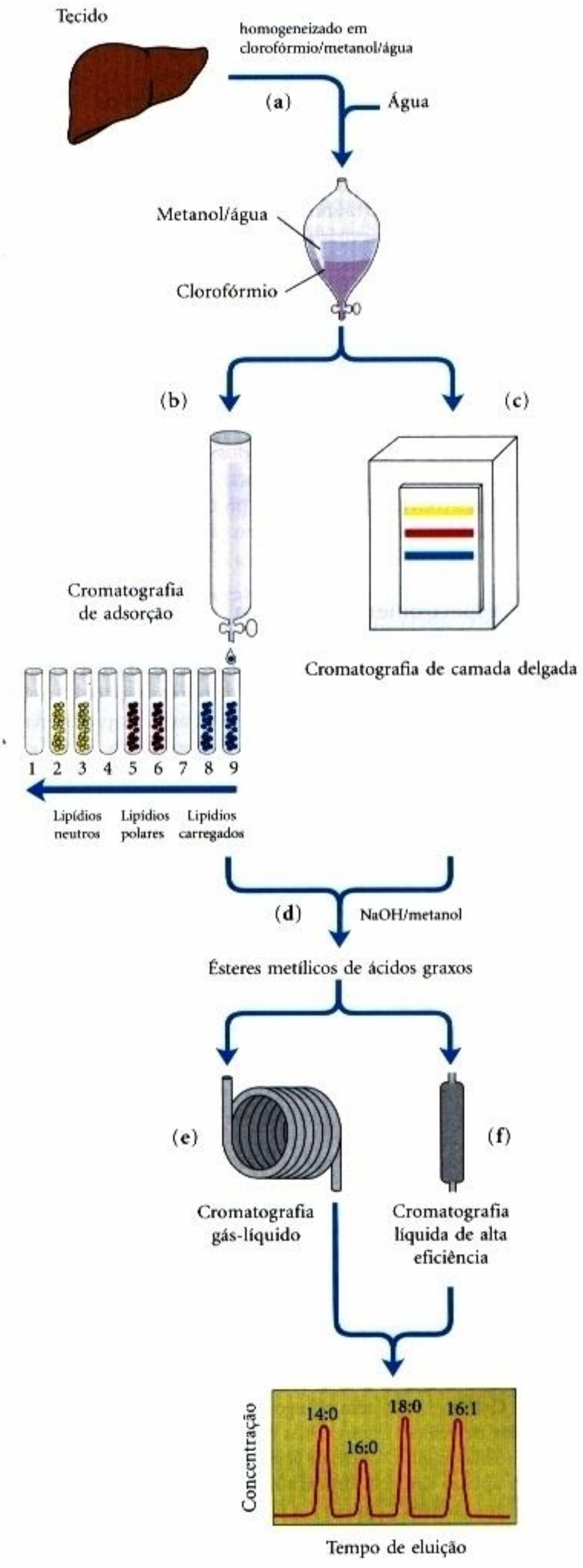

Tecido
homogeneizado em clorofórmio/metanol/água
(a)
Água
Metanol/água
Clorofórmio
(b)
(c)
Cromatografia de adsorção
Cromatografia de camada delgada
1 2 3 4 5 6 7 8 9
Lipídios neutros
Lipídios polares
Lipídios carregados
(d)
NaOH/metanol
Ésteres metílicos de ácidos graxos
(e)
(f)
Cromatografia gás-líquido
Cromatografia líquida de alta eficiência
Concentração
14:0
16:0
18:0
16:1
Tempo de eluição

Figura 11-21 – Procedimentos usuais empregados na extração, separação e identificação de lipídios celulares. (**a**) O tecido é homogeneizado em uma mistura de clorofórmio/metanol/água, a qual após centrifugação para a remoção do resíduo não extraível, fornece duas fases pela adição de água. Diferentes tipos de lipídios extraídos na fase de clorofórmio podem ser separados por (**b**) cromatografia de adsorção em coluna de sílica-gel, eluida com solventes de polaridade crescente, ou (**c**) cromatografia de camada delgada (TLC), na qual lipídios são levados através de uma placa coberta com sílica-gel, por uma frente de solvente ascendente, onde lipídios menos polares migram distâncias maiores do que os mais polares ou carregados eletricamente. Com solventes apropriados, a TLC pode ser usada para separar espécies lipídicas muito semelhantes; por exemplo, os lipídios carregados, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol ou fosfatidilinositol podem ser facilmente separados por TLC. Para a determinação da composição em ácidos graxos, uma fração lipídica contendo ácidos graxos ligados como ésteres é transesterificada a quente em uma solução aquosa de NaOH e metanol (**d**), produzindo uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos. Esses ésteres metílicos são então separados de acordo com o seu comprimento de cadeia e o grau de saturação por (**e**) cromatografia gás-líquida (GLC) ou (**f**) cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Determinação precisa da massa molecular por espectrometria de massa (veja Adendo 5-3) permite a identificação de lipídios individuais sem ambigüidade.

da com os vapores do solvente. Enquanto o solvente ascende pela placa por ação capilar, os lipídios são carreados também (Fig. 11-21c). Os lipídios menos polares são os que migram, em distâncias maiores, pois têm menos tendência a se ligar ao ácido silícico. Após a separação, os lipídios podem ser identificados pela nebulização da placa com um corante (rodamina) que fluoresce quando associado a lipídios, ou por exposição da placa a vapores de iodo. Iodo reage reversivelmente com as duplas ligações nos ácidos graxos, de modo que lipídios contendo ácidos graxos insaturados desenvolvem uma cor amarela ou marrom. Existem outros reagentes que, por nebulização, são úteis para identificar lipídios específicos. Para análises subseqüentes, as regiões contendo os lipídios separados podem ser removidas da placa e os lipídios recuperados por extração com um solvente orgânico.

Cromatografia gás-líquido separa misturas de derivados voláteis de lipídios

Cromatografia gás-líquido separa componentes voláteis de uma mistura, de acordo com suas tendências relativas de se dissolver no material inerte empacotado na coluna de cromatografia e de se volatilizar e se mover através da coluna, carreados por uma corrente de um gás inerte como o hélio. Alguns lipídios são naturalmente voláteis, mas outros devem ser derivatizados para aumentar sua volatibilidade (ou seja, diminuir seu ponto de ebulição). Para uma análise de ácidos graxos em uma amostra de fosfolipídios, os lipídios são inicialmente aquecidos em misturas metanol/HCl ou metanol/NaOH, que convertem ácidos graxos esterificados com o glicerol em ésteres metílicos (transesterificação). Esses acilmetil ésteres graxos são introduzidos na coluna de cromatografia gás-líquido, e a coluna é aquecida para volatilizar os compostos. Os aciléstercs graxos mais solúveis no material inerte da coluna se particionam (se dissolvem) nesse material; aqueles menos solúveis são levados pela corrente de gás hélio e emergem primeiro na saída da coluna. A ordem de eluição depende da natureza do adsorvente na coluna e do ponto de ebulição dos componentes da mistura líquida. Usando essas técnicas, misturas de ácidos graxos de vários comprimentos de cadeia e de vários graus de insaturação podem ser completamente separadas (Fig. 11-21e).

A hidrólise específica ajuda na determinação da estrutura de lipídios

Certas classes de lipídios são suscetíveis à degradação em condições específicas. Por exemplo, todos os ácidos graxos em ligação éster em triglicerídios, fosfolipídios e em ésteres de esteróis são liberados por tratamento brando com ácidos ou bases, e condições de hidrólise pouco mais drásticas liberam ácidos graxos de ligações amida em esfingolipídios. Enzimas que especificamente hidrolisam certos lipídios são também úteis na determinação da estrutura de lipídios. Fosfolipases A, C, e D (Fig. 11-13) podem, cada uma, quebrar ligações específicas em fosfolipídios e fornecer produtos com solubilidades e comportamentos característicos. Fosfolipase C, por exemplo, libera um álcool fosforilado (como fosfocolina de fosfatidilcolina), solúvel em água, e um diacilglicerol, solúvel em clorofórmio; ambos podem ser caracterizados separadamente para determinar a estrutura do fosfolipídio intacto. A combinação de hidrólise específica com caracterização dos produtos por cromatografia de camada delgada de alta eficiência ou gás-líquido freqüentemente permite a determinação da estrutura do lipídio.

Espectrometria de massa revela a estrutura completa de lipídios

Para estabelecer definitivamente o comprimento de uma cadeia hidrocarbônica ou a posição de duplas ligações, a análise espectral de massa de lipídios é inestimável. As propriedades químicas de lipídios similares (por exemplo, dois ácidos graxos insaturados em posições diferentes, ou dois isoprenóides com diferentes números de unidades de isopreno) são muito semelhantes, e sua posição de eluição nos vários procedimentos cromatográficos freqüentemente não distingue entre eles. Quando os eluatos de colunas cromatográficas são constantemente amostrados por espectrometria de massa, os componentes de uma mistura lipídica podem ser simultaneamente separados e identificados.

Resumo

Lipídios são componentes celulares insolúveis em água que podem ser extraídos com solventes não-polares. Alguns lipídios servem como componentes estruturais de membranas e outros como forma de armazenamento de combustíveis. Ácidos graxos, que fornecem os componentes hidrocarbônicos de muitos lipídios, freqüentemente têm número par de átomos de carbono (geralmente 12 a 24) e podem ser saturados ou insaturados; ácidos graxos insaturados têm duplas ligações na configuração *cis*. Na maioria dos ácidos graxos insaturados, uma dupla ligação está na posição Δ^9 (entre C-9 e C-10).

Triacilgliceróis contêm três moléculas de ácidos graxos esterificados aos três grupos hidroxila do glicerol. Triacilgliceróis simples contêm apenas um tipo de ácido graxo; triacilgliceróis mistos contêm dois ou três tipos. Triacilgliceróis são primariamente gorduras de armazenamento; eles estão presentes em muitos tipos de alimentos.

Os lipídios polares com cabeças polares e caudas não-polares são os componentes principais de membranas. Os mais abundantes são os glicerofosfolipídios, que contêm duas moléculas de ácidos graxos esterificadas com dois grupos hidroxila do glicerol, e um segundo álcool, o grupo-cabeça, esterificado com a terceira hidroxila do glicerol por uma ligação fosfodiéster. Glicerofosfolipídios diferem na estrutura do grupo-cabeça; glicerofosfolipídios comuns são fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina. As cabeças polares dos glicerofosfolipídios apresentam cargas elétricas em pH próximo de 7. Os esfingolipídios, também componentes de membrana, contêm esfingosina, um aminoálcool alifático de cadeia longa, mas não contêm glicerol. Esfingomielina tem, além de ácido fosfórico e colina, duas longas cadeias hidrocarbonadas, uma contribuída por um ácido graxo e a outra por esfingosina. Três outras classes de esfingolipídios são cerebrosídios, globosídios e gangliosídios, os quais contêm açúcares como componentes. Colesterol, um esterol, é um precursor de esteróides e um componente importante da membrana plasmática de células animais.

Alguns tipos de lipídios, ainda que presentes em quantidades relativamente baixas, têm papéis críticos como co-fatores ou sinais. Fosfatidilinositol é hidrolisado fornecendo dois mensageiros intracelulares, diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato. Prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos são hormônios extremamente potentes, derivados de araquidonato. Hormônios esteroidais são derivados dos esteróis. Vitaminas D, A, E, e K são compostos lipossolúveis contendo unidades de isopreno. Todas têm papéis essenciais no metabolismo ou na fisiologia de animais. Vitamina D é o precursor de um hormônio que regula o metabolismo de cálcio. Vitamina A fornece o pigmento visual dos olhos dos vertebrados e age como um regulador da expressão gênica durante o crescimento da célula epitelial. Vitamina E funciona como protetor dos lipídios de membrana contra danos oxidativos, e a vitamina K é essencial para o processo de coagulação do sangue. Ubiquinonas e plastoquinonas, derivados isoprenóides, funcionam como transportadores de elétrons em mitocôndrias e cloroplastos, respectivamente. Dolicóis ativam e ancoram açúcares em membranas celulares para uso na síntese de certos carboidratos complexos, glicolipídios e glicoproteínas.

Na determinação da composição lipídica, lipídios são extraídos dos tecidos com solventes orgânicos e separados por cromatografia em camada delgada, gás-líquido e de alta eficiência. Lipídios individuais são identificados pelo seu comportamento cromatográfico, sua suscetibilidade à hidrólise por enzimas específicas ou por espectrometria de massa.

Leitura Adicional

Geral

Gurr MI & Harwood JL. (1990) *Lipid Biochemistry: An introduction,* 4th edn, Chapman & Hall, London.

Uma boa fonte geral sobre a estrutura e o metabolismo de lipídios, em nível intermediário.

Harwood JL & Russell NJ. (1984) *Lipids in Plants and Microbes,* George Allen & Unwin, Ltd., London.

Descrições curtas e claras de tipos de lipídios, sua distribuição, metabolismo e função em plantas e micróbios, em nível intermediário.

Mead JF, Alfin-Slater RB, Howton DR, & Popják G. (1986) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes,* New Comprehensive Biochemistry, Vol. 31, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Uma excelente coleção de revisões sobre os vários aspectos da estrutura de lipídios, biossíntese e função.

Lipídios estruturais e membranas

Gravel RA, Clarke JTR, Kaback MM, Mahuran D, Sandhoff K, & Suzuki K. (1995) The GM$_2$ gangliosidoses. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th edn (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, & Valle D, eds), pp. 2839-2879, McGraw-Hill, Inc., New York.

Este artigo, um dos muitos nesta obra de três volumes que contêm descrições exaustivas dos aspectos clínicos, bioquímicos e genéticos de centenas de doenças metabólicas humanas, é uma fonte autorizada e de leitura fascinante.

Hakamori S. (1986) Glycosphingolipids. *Sci. Am.* **254** (May), 44-53.

Hoekstra D (ed). (1994) *Cell Lipids,* Current Topics in Membranes, Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego.

Ostro MJ. (1987) Liposomes. *Sci. Am.* **256** (January), 102-111.

Sastry PS. (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 24, 69-176.

Spector AA & Yorek MA. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* **26**, 1015-1035.

Lipídios com atividades biológicas específicas

Bell RM, Exton JH, & Prescott SM (eds). (1996) *Lipid Second Messengers,* Handbook of Lipid Research, Vol. 8, Plenum Press, New York.

Chojnacki, T. & Dallner G. (1988) The biological role of dolichol. *Biochem. J.* **251**, 1-9.

Machlin LJ, & Bendich A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1, 441-445.

Breve discussão sobre tocoferóis como antioxidantes e seu papel na prevenção de danos por radicais livres de oxigênio.

Prescott SM, Zimmerman GA, & McIntyre TM. (1990) Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 17.381-17.384.

Snyder F, Lee T-C, & Blank ML. (1989) Platelet-activating factor and related ether lipid mediators: biological activities, metabolism, and regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **568**, 35-43.

Suttie JW. (1993) Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J.* 7, 445-452.

Vermeer C. (1990) γ-Carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* **266**, 625-636.

Descreve a base bioquímica do papel da vitamina K na coagulação do sangue e a importância da carboxilação na síntese da proteína da coagulação, trombina.

Viitala J & Järnefelt J. (1985) The red cell surface revisited. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 392-395.

Inclui discussão dos determinantes dos tipos sangüíneos humanos, A, B e O.

Separação e análise de lipídios

Kates M. (1986) *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids,* 2nd edn, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 3, Part 2 (Burdon RH & van Knippenberg PH, eds), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Matsubara T & Hagashi A. (1991) FAB/Mass spectrometry of lipids. *Prog. Lipid Res.* **30**, 301-322.

Uma discussão especializada sobre a identificação de lipídios por espectrometria de bombardeio rápido de átomos (FAB), uma técnica poderosa para determinação de estrutura.

Problemas

1. **Definição operacional de lipídios.** Como a definição de "lipídio" difere de outros tipos de definição usada para outras biomoléculas que foram estudadas, tais como aminoácidos, ácidos nucléicos e proteínas?

2. **Pontos de fusão de lipídios.** Os pontos de fusão de uma série ácidos graxos de 18 carbonos são: ácido esteárico, 69,6°C; ácido oléico, 13,4°C; ácido linoléico, −5°C; e ácido linolênico, −11°C. (a) Qual aspecto estrutural desses ácidos graxos de 18 carbonos pode ser relacionado aos pontos de fusão? Mostre uma explicação molecular para a tendência nos pontos de fusão. (b) Desenhe todos os triacilgliceróis possíveis que podem ser construídos de glicerol, ácido palmítico e ácido oléico. Organiza-os em ordem crescente de ponto de fusão. (c) Ácidos graxos de cadeia ramificada são encontrados em alguns lipídios de membranas bacterianas. A presença deles aumentaria ou diminuiria a fluidez das membranas (ou seja, seus pontos de fusão seriam menores ou maiores)? Por que?

3. **Preparo de molho "Béarnaise".** Durante a preparação do molho Béarnaise, gemas de ovo são incorporadas na manteiga fundida para estabilizar o molho e impedir a separação. O fator de estabilização na gema do ovo é lecitina (fosfatidilcolina). Sugira por que isso funciona.

4. **Componentes hidrofóbicos e hidrofílicos dos lipídios de membranas.** Um aspecto estrutural comum nas moléculas de lipídios de membranas é sua natureza anfipática. Por exemplo, na fosfatidilcolina, as duas cadeias de ácidos graxos são hidrofóbicas e a cabeça polar, fosfocolina, é hidrofílica. Para cada um dos seguintes lipídios de membrana, identifique os componentes que servem como unidades hidrofóbicas e unidades hidrofílicas: (a) fosfatidiletanolamina; (b) esfingomielina; (c) galactosilcerebrosídio; (d) gangliosídio; (e) colesterol.

5. **Labilidade alcalina de triacigliceróis.** Uma maneira comum de limpar o esgoto de pia de cozinha é usar um produto contendo hidróxido de sódio. Explique por que isso é eficiente.

6. **A ação de fosfolipases.** O veneno da cascavel oriental (*Crotalus adamanteus*) e da naja Indiana contêm fosfolipase A_2, que catalisa a hidrólise de ácidos graxos na posição C-2 de glicerofosfolipídios. O fosfolipídio, produto dessa reação, é a lisolecitina (lecitina é fosfatidilcolina). Em altas concentrações, este e outros lisofosfolipídios agem como detergentes, dissolvendo as membranas dos eritrócitos e lisando as células. Hemólise extensa pode ser mortal.

(a) Detergentes são anfipáticos. Quais são os segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos da lisolecitina?

(b) A dor e a inflamação causadas por mordida de cobra podem ser tratadas com certos esteróides. Qual é a base desse tratamento?

(c) Altos níveis de fosfolipase A_2 podem ser mortais, mas apesar disso essa enzima é necessária para uma variedade de processos metabólicos normais. Quais são esses processos?

7. **Mensageiros intracelulares a partir de fosfatidilinositóis.** Quando o hormônio vasopressina estimula a clivagem de fosfatidilinositol 4,5-difosfato pela fosfolipase C sensível ao hormônio, dois produtos são formados. Compare suas propriedades e suas solubilidades em água, e prediga se cada um deles se difundirá com facilidade por meio do citosol.

8. **Armazenamento de vitaminas lipossolúveis.** Em contraste com vitaminas hidrossolúveis, que devem ser parte de nossa dieta diária, as vitaminas lipossolúveis podem ser armazenadas no corpo em quantidades suficientes para muitos meses. Sugira uma explicação para essa diferença baseada em solubilidades.

9. **Hidrólise de lipídios.** Nomeie os produtos da hidrólise branda com NaOH de (a) 1-estearoil-2,3-dipalmitoilglicerol; (b) 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina.

10. **Efeito da polaridade na solubilidade.** Organize os seguintes compostos em ordem crescente de solubilidade: um triacilglicerol, um diacilglicerol e um monoacilglicerol, todos contendo somente ácido palmítico.

11. **Separação cromatográfica de lipídios.** Uma mistura de lipídios é aplicada a uma coluna de sílica-gel, e a coluna é lavada com solventes de polaridade crescente. A mistura consiste de: fosfatidilserina, colesteril palmitato (um éster de esterol), fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina, ácido palmítico, *n*-tetradecanol, triacilglicerol e colesterol. Em que ordem você espera a eluição dos lipídios da coluna?

12. **Identificação de lipídios desconhecidos.** Johann Thudichum, que exercia a Medicina em Londres 100 anos atrás, dedicava-se também, em seu tempo livre, à química de lipídios. Ele isolou vários lipídios do tecido neural, muitos dos quais foram caracterizados e nomeados. Seus pequenos frascos cuidadosamente selados e identificados contendo lipídios isolados foram redescobertos muitos anos mais tarde. (a) Como você confirmaria, usando técnicas não disponíveis para Thudichum, que os frasquinhos identificados como contendo "esfingomielina" e "cerebrosídio", realmente, continham esses compostos? (b) Como você distinguiria esfingomielina de fosfatidilcolina por testes químicos, físicos e enzimáticos?

13. **Ninidrina para revelar lipídios em placas de TLC.** Ninidrina reage especificamente com aminas primárias para formar um produto azul-púrpura. Uma cromatografia de camada delgada de fosfolipídios de fígado de rato é pulverizada com ninidrina e mantida até o desenvolvimento da cor. Quais fosfolipídios podem ser detectados dessa maneira?

CAPÍTULO 12

Membranas Biológicas e Transporte

A primeira célula provavelmente surgiu quando uma membrana formada, englobando um pequeno volume de solução aquosa, separava-a do restante do universo. As membranas definem o limite externo das células e regulam o trânsito molecular através desse limite; nas células eucarióticas, elas dividem o espaço interno em compartimentos distintos para separar processos e componentes (Fig. 12-1). Elas organizam seqüências de reações complexas e são essenciais tanto para a conservação da energia quanto para a comunicação célula-célula. As atividades biológicas das membranas devem-se a suas notáveis propriedades físicas. As membranas são flexíveis, auto-selantes e seletivamente permeáveis aos solutos polares. Sua flexibilidade permite alterações, de forma que acompanham o crescimento celular e a movimentação (como o movimento amebóide). Com sua habilidade de se romper e selar, duas membranas podem-se fundir, como na exocitose, ou um compartimento envolto por uma membrana pode sofrer fissão produzindo dois compartimentos selados, como na endocitose ou na divisão celular, sem que ocorram grandes perdas através das superfícies celulares. Pelo fato de as membranas serem seletivamente permeáveis, elas retêm certos compostos e íons dentro das células e de compartimentos celulares específicos, enquanto excluem outros.

As membranas não são somente barreiras passivas. Elas incluem um conjunto de proteínas especializadas na promoção ou na catálise de uma variedade de processos celulares. Na superfície celular, transportadores conduzem solutos orgânicos específicos e íons através da membrana; receptores captam sinais extracelulares e desencadeiam alterações moleculares na célula; moléculas de adesão mantêm células vizinhas juntas. Dentro da célula, as membranas organizam processos celulares, como a síntese de lipídios e de certas proteínas, e as transduções de energia nas mitocôndrias e nos cloroplastos. As membranas consistem de apenas duas camadas de moléculas e são, portanto, muito finas; elas são essencialmente bidimensionais. Pelo fato de as colisões intermoleculares serem muito mais prováveis nesse espaço bidimensional do que no tridimensional, a eficiência de processos catalisados por enzimas organizadas dentro de membranas é grandemente aumentada.

Neste capítulo descreveremos, primeiro, a composição das membranas celulares e sua arquitetura química — estruturas moleculares dinâmicas que propiciam suas funções biológicas. Descreveremos várias classes de proteínas de membrana definidas pela maneira com que se associam com a bicamada lipídica. Adesão celular, endocitose e fusão de membranas, a qual ocorre com infecção viral, ilustrarão o papel dinâmico das proteínas de membrana. Depois, trataremos da passagem de solutos através da membrana, mediada por proteínas, por meio de transportadores e canais iônicos. Em capítulos posteriores, discutiremos o papel das membranas na transdução de sinais (Capítulos 13 e 23), na transdução de energia (Capítulo 19), na síntese de lipídios (Capítulo 21) e na síntese das proteínas (Capítulo 27).

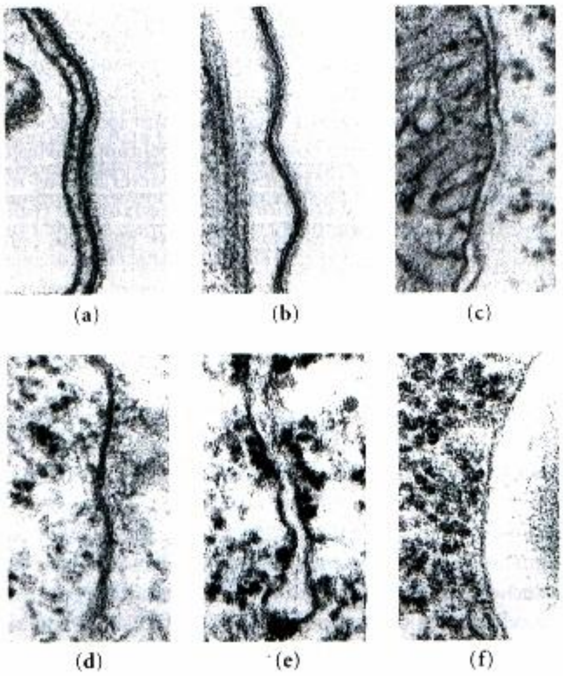


Figura 12-1 – Membranas biológicas. Vistas em secção transversal, todas as membranas intracelulares compartilham uma aparência trilaminar característica. O protozoário *Paramecium* contém uma variedade de organelas envoltas por membranas. Quando um corte fino de um *Paramecium* é corado com tetróxido de ósmio para realçar as membranas, cada uma delas aparece com uma estrutura de três camadas, de 5 a 8nm (50 a 80Å) de espessura. As imagens trilaminares consistem de duas camadas eletrodensas nas superfícies interna e externa, separadas por uma região central menos densa. Acima estão imagens em grande aumento das membranas de: (**a**) um corpo celular (membranas plasmática e alveolar, estreitamente justapostas); (**b**) um cílio; (**c**) uma mitocôndria; (**d**) um vacúolo digestivo; (**e**) o retículo endoplasmático; e (**f**) uma vesícula secretora.

Os Constituintes Moleculares das Membranas

Uma maneira para entender a função da membrana é estudar sua composição — determinar, por exemplo, quais componentes são comuns a todas as membranas e quais são exclusivos de membranas com funções específicas. Antes de descrevermos a estrutura e a função das membranas, consideraremos, portanto, os componentes moleculares das membranas: as proteínas e os lipídios polares, que são responsáveis por quase toda a massa de membranas biológicas, e carboidratos presentes como parte de glicoproteínas e glicolipídios.

Tabela 12-1 – Componentes principais das membranas plasmáticas em vários organismos

	Componentes (% em peso)				
	Proteínas	**Fosfolipídios**	**Esterol**	**Tipo esterol**	**Outros lipídios**
Bainha de mielina humana	30	30	19	Colesterol	Galactolipídios, plasmalogens
Fígado de camundongo	45	27	25	Colesterol	—
Folha de milho	47	26	7	Sitosterol	Galactolipídios
Levedura	52	7	4	Ergosterol	Triacilgliceróis, ésteres de esteróis
Paramecium (protista ciliado)	56	40	4	Estigmasterol	—
E. coli	75	25	0	—	—

Cada tipo de membrana possui lipídios e proteínas características

As proporções relativas de proteínas e lipídios variam com o tipo de membrana (Tabela 12-1), refletindo a diversidade dos papéis biológicos. Por exemplo, certos neurônios possuem uma bainha de mielina, uma extensão da membrana plasmática que se enrola na célula muitas vezes e atua como um isolante elétrico passivo. A bainha de mielina consiste principalmente de lipídios, enquanto as membranas plasmáticas das bactérias e as membranas das mitocôndrias e dos cloroplastos, em que se realizam muitos processos metabólicos catalisados por enzimas, contêm mais proteínas do que lipídios.

Para os estudos da composição da membrana, a primeira tarefa é isolar a membrana selecionada. Quando células eucarióticas são submetidas a forças mecânicas de cisalhamento, suas membranas plasmáticas são rompidas e fragmentadas, liberando os componentes citoplasmáticos e as organelas envoltas por membranas, tais como as mitocôndrias, os cloroplastos, os lisossomos e os núcleos. Os fragmentos da membrana plasmática e as organelas intactas podem ser isolados por técnicas de centrifugação descritas no Capítulo 2 (veja Fig. 2-20).

A análise química das membranas isoladas de várias fontes revela certas propriedades comuns. Cada reino, espécie, tecido ou tipo celular e as organelas de cada tipo celular possuem um conjunto característico de lipídios de membrana. As membranas plasmáticas dos hepatócitos, por exemplo, são enriquecidas em colesterol e não contêm cardiolipina detectável (Fig. 12-2); na membrana mitocondrial interna dos hepatócitos, essa distribuição é reversa. As células, claramente, possuem mecanismos para controlar as espécies e as quantidades de lipídios de membrana que elas sintetizam e para direcionar lipídios específicos para as organelas particulares. Em muitos casos, podemos imaginar vantagens adaptativas de distintas combinações de lipídios de membrana; em outros casos, o significado funcional dessas combinações permanece a ser descoberto.

A composição das proteínas de membranas de várias fontes varia ainda mais intensamente do que a sua composição lipídica, refletindo especialização funcional. Em uma célula de bastonete da retina de vertebrado, uma porção da célula é altamente especializada para a recepção da luz; mais de 90% das proteínas da membrana plasmática, nessa região, é a glicoproteína rodopsina, que absorve a luz. A membrana plasmática do eritrócito, menos especializada, possui cerca de 20 tipos de proteínas proeminentes, bem como dezenas de secundárias; muitas das quais são transportadores, cada uma levando um soluto específico através da membrana. A membrana plasmática da *Escherichia coli* contém centenas de proteínas diferentes, incluindo transportadores e muitas enzimas envolvidas no metabolismo da conservação de energia, síntese de lipídios, transporte de proteínas e divisão celular. A camada externa da *E. coli* possui uma função diferente (proteção) e um conjunto de proteínas diferentes.

Algumas proteínas de membrana estão covalentemente ligadas a um dispositivo complexo de carboidratos. Por exemplo, na glicoforina, uma glicoproteína da membrana plasmática do eritrócito, 60% da massa consiste de unidades de oligossacarídeos complexos, ligadas covalentemente a resíduos específicos de aminoácidos. Os resíduos de Ser, Thr e Asn são os pontos de ligação mais comuns (veja Fig. 9-25). A outra extremidade da escala é a rodopsina da membrana plasmática da célula bastonete, que contém um único hexassacarídeo. As porções açúcar das glicoproteínas de superfície influenciam o enovelamento da proteína, bem como sua estabilidade e destino intracelular, e desempenham um papel significativo na ligação específica de ligantes aos receptores glicoprotéicos de superfície (veja Fig. 9-29). Diferentemente das membranas plasmáticas, as membranas intracelulares como as de mitocôndrias e cloroplastos raramente contêm carboidratos ligados covalentemente.

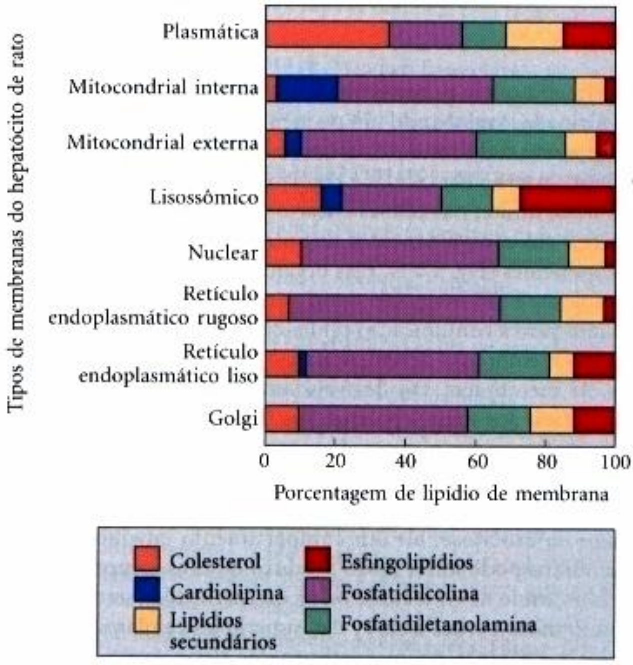


Figura 12-2 – Composição lipídica da membrana plasmática e de membranas das organelas de um hepatócito de rato. A especialização funcional de cada tipo de membrana está refletida em sua composição lipídica única. O colesterol (laranja) é proeminente nas membranas plasmáticas, mas apenas detectável nas membranas mitocondriais. A cardiolipina (azul) é um componente principal da membrana mitocondrial interna, mas não da membrana plasmática. Fosfatidilserina, fosfatidilinositol e fosfatidilglicerol (amarelo) são componentes relativamente escassos na maioria das membranas, mas podem desempenhar funções críticas. Fosfatidilinositol e seus derivativos, por exemplo, são importantes nas transduções de sinais desencadeadas por hormônios. Esfingolipídios (vermelho), fosfatidilcolina (púrpura) e fosfatidiletanolamina (verde) estão presentes na maioria das membranas, mas em diferentes proporções. Glicolipídios, que são os principais componentes das membranas dos cloroplastos de plantas, estão virtualmente ausentes das células animais.

Algumas proteínas de membrana estão ligadas covalentemente a um ou mais lipídios que, como veremos, funcionam como âncoras hidrofóbicas segurando as proteínas na membrana.

A Arquitetura Supramolecular das Membranas

Todas as membranas biológicas compartilham certas propriedades fundamentais. Elas são impermeáveis à maioria dos solutos polares ou carregados, mas permeáveis aos compostos não-polares; apresentam de 5 a 8nm (50 a 80Å) de espessura e parecem trilaminares quando vistas por meio de um corte transversal ao microscópio eletrônico (Fig. 12-1). A evidência proveniente tanto da microscopia eletrônica e de estudos da composição química, bem como de estudos físicos de permeabilidade e da mobilidade individual de moléculas de proteínas e lipídios dentro da membrana, levou ao desenvolvimento do **modelo do mosaico fluido** para a estrutura das membranas biológicas (Fig. 12-3). Fosfolipídios e esteróis formam uma bicamada de lipídio na qual as regiões não-polares das moléculas dos lipídios são orientadas para o centro da bicamada, e os grupos polares, para o exterior. Nessa lâmina da bicamada, as proteínas globulares estão incrustadas em intervalos irregulares, mantidos pelas interações hidrofóbicas entre os lipídios da membrana e os domínios hidrofóbicos nas proteínas. Algumas proteínas projetam-se em um dos lados da membrana; outras possuem domínios expostos em ambos os lados. Considerando o "lado" da membrana, a orientação das proteínas na bicamada é assimétrica; os domínios protéicos expostos em um dos lados da bicamada são diferentes dos expostos no outro lado, refletindo a assimetria funcional. As unidades protéicas e lipídicas individualizadas em uma membrana formam o mosaico fluido, cujo padrão, diferentemente de um mosaico de ladrilhos de cerâmica em argamassa, é livre para se alterar constantemente. O mosaico da membrana é **fluido** pelo fato de as interações entre seus componentes não serem covalentes, deixando liberdade para as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas se movimentarem lateralmente no plano da membrana.

Examinaremos com mais detalhes algumas dessas características do modelo do mosaico fluido e consideraremos a evidência experimental que confirma o modelo.

A bicamada de lipídio é o elemento estrutural básico das membranas

Glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteróis são praticamente insolúveis em água. Quando misturados com a água, formam espontaneamente agregados lipídicos microscópicos em uma fase separada de sua vizinhança aquosa, agrupando-se com suas porções hidrofóbicas se contactando mutuamente e seus grupos hidrofílicos interagindo com a água que a cerca. Lembre-se de que o agregado de lipídios reduz a quantidade da superfície hidrofóbica exposta à água e, dessa forma, minimiza o número de moléculas da camada de água organizada na interface água-lipídio (veja Fig. 4-7), resultando em aumento na entropia. Interações hidrofóbicas entre moléculas de lipídios fornecem a força termodinâmica direcionadora para a formação e a manutenção desses agregados.

Dependendo de condições claramente definidas e da natureza dos lipídios, três tipos de agregados de lipídios podem-se formar quando lipídios anfipáticos são misturados com a água (Fig. 12-4). **Micelas** são estruturas esféricas contendo de algumas dúzias a alguns milhares de moléculas arranjadas com suas regiões hidrofóbicas agregadas no interior, excluindo a água, e seus grupos cabeça hidrofílicos na superfície em contato com a água. A formação de micelas é favorecida quando a área transversal dos grupos carregados é maior do que a cadeia(s) de acila(s) lateral(is), como no ácido graxo livre, nos lisofosfolipídios (fosfolipídios sem um ácido graxo) e em detergentes como o dodecil sulfato de sódio (SDS; pág. 104).

Um segundo tipo de agregado lipídico na água é a **bicamada**, na qual duas monocamadas de lipídios formam uma lâmina bidimensional. A formação da bicamada ocorre mais facilmente quando as áreas transversais dos grupos cabeça e as cadeias de acilas laterais são semelhantes, como nos glicerofosfolipídios e

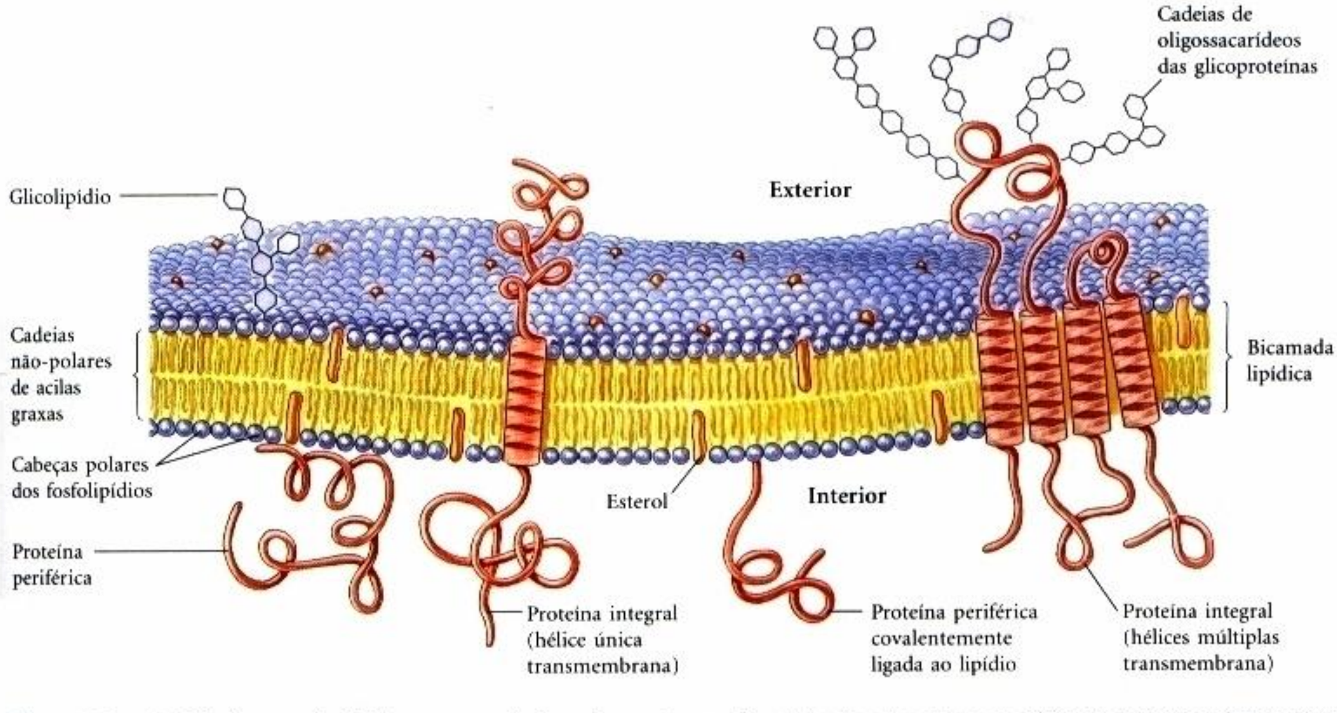

Cadeias de oligossacarídeos das glicoproteínas
Glicolipídio
Exterior
Cadeias não-polares de acilas graxas
Bicamada lipídica
Cabeças polares dos fosfolipídios
Esterol
Interior
Proteína periférica
Proteína integral (hélice única transmembrana)
Proteína periférica covalentemente ligada ao lipídio
Proteína integral (hélices múltiplas transmembrana)

Figura 12-3 – Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana. As cadeias de acilas graxas no interior da membrana formam uma região hidrofóbica fluida. As proteínas integrais de membrana flutuam nesse mar de lipídios, mantidas pelas interações hidrofóbicas com as cadeias laterais não-polares de seus aminoácidos. Tanto as proteínas quanto os lipídios são livres para se movimentar lateralmente no plano da bicamada, mas a movimentação de qualquer um, de uma face da bicamada até a outra, é restrita. As porções carboidrato ligadas a algumas proteínas e lipídios da membrana plasmática estão expostas na face extracelular da membrana.

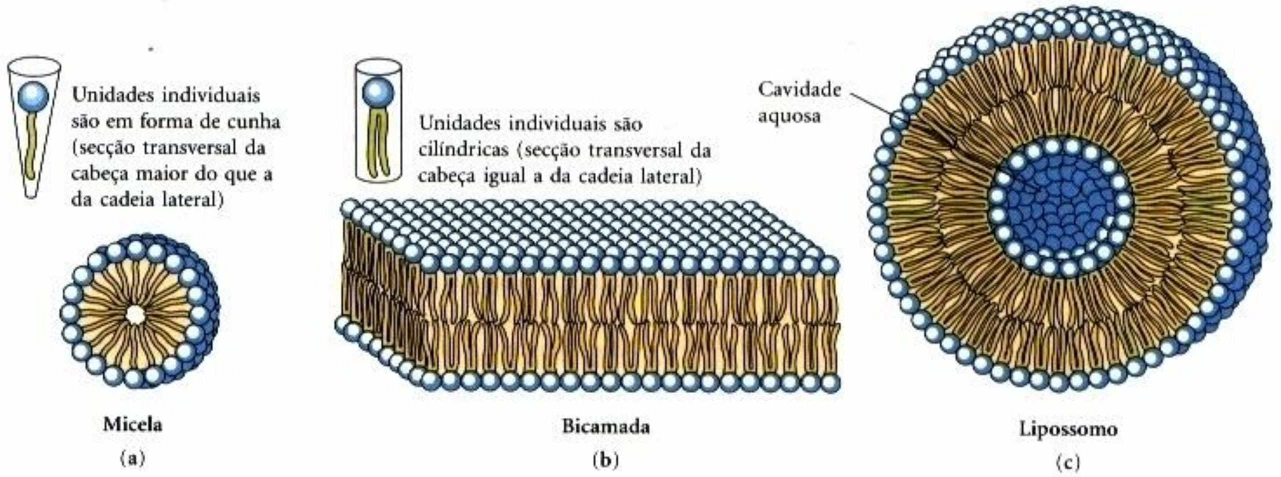
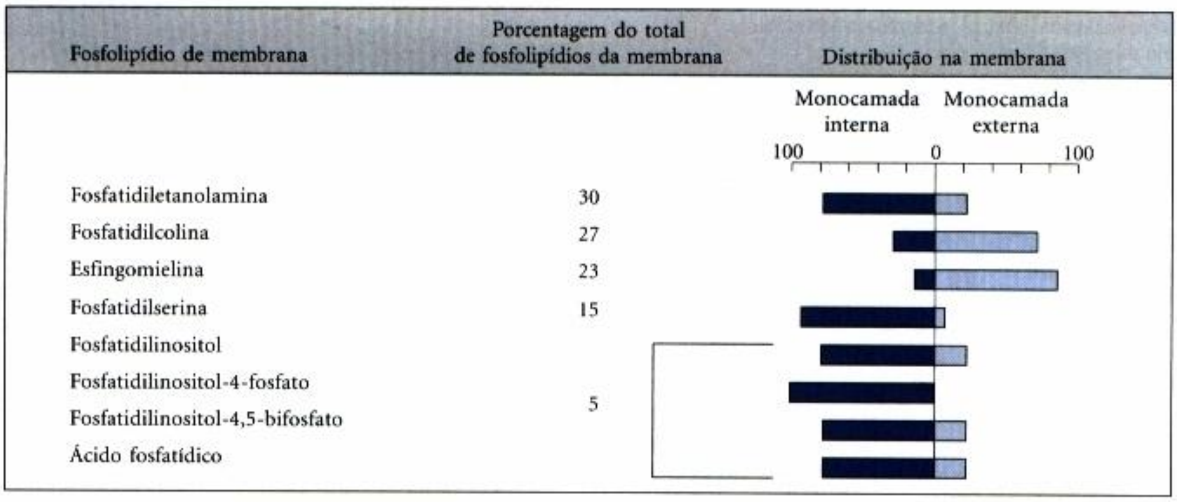

Unidades individuais são em forma de cunha (secção transversal da cabeça maior do que a da cadeia lateral)
Unidades individuais são cilíndricas (secção transversal da cabeça igual a da cadeia lateral)
Cavidade aquosa
Micela
(a)
Bicamada
(b)
Lipossomo
(c)

Figura 12-4 – Agregados lipídicos anfipáticos que se formam na água. (**a**) Nas micelas, as cadeias anfipáticas dos ácidos graxos são seqüestradas no núcleo da esfera. Praticamente não há água no interior hidrofóbico. (**b**) Na bicamada aberta, todas as cadeias de acilas laterais, exceto aquelas nas margens da lâmina, são protegidas da interação com a água. (**c**) Quando uma bicamada bidimensional se dobra, ela forma uma bicamada fechada, uma vesícula tridimensional oca (lipossomo) envolvendo uma cavidade aquosa.

nos esfingolipídios. As porções hidrofóbicas em cada monocamada, excluídas de água, interagem entre si. Os grupos hidrofílicos carregados interagem com a água na superfície da bicamada. Pelo fato de as regiões hidrofóbicas em suas margens (Fig. 12-4b) estarem transitoriamente em contato com a água, a lâmina da bicamada é relativamente instável e, espontaneamente, forma um terceiro tipo de agregado: ela se dobra para formar uma esfera oca chamada de vesícula ou **lipossomo**. Formando as vesículas, as bicamadas perdem suas regiões hidrofóbicas marginais, alcançando estabilidade máxima em seu ambiente aquoso. Essas vesículas de bicamadas envolvem a água, criando um compartimento aquoso separado. É provável que a primeira célula viva se assemelhasse aos lipossomos, seus conteúdos aquosos segregados do resto do mundo por uma casca hidrofóbica.

Toda evidência indica que as membranas biológicas são constituídas de bicamadas de lipídios. A espessura das membranas, medida por microscopia eletrônica, é aquela esperada para uma bicamada de lipídio de 3nm (30Å) de espessura, com as proteínas projetando-se de cada lado. Estudos de difração de raios X das membranas apresentam a distribuição da densidade eletrônica esperada para uma estrutura de bicamada. E os lipossomos formados no laboratório apresentam a mesma impermeabilidade relativa aos solutos polares que os encontrados nas membranas biológicas (embora estas últimas, como veremos, sejam permeáveis aos solutos para os quais tenham transportadores específicos).

Os lipídios de membrana são distribuídos assimetricamente entre as duas monocamadas da bicamada, embora a assimetria, diferentemente das proteínas de membrana, não seja absoluta. Na membrana plasmática, por exemplo, certos lipídios são tipicamente encontrados principalmente na monocamada externa e outros na monocamada interna (ou citosólica), mas raramente um lipídio é encontrado apenas em um lado e no outro não (Fig. 12-5).



Fosfolipídio de membrana	Porcentagem do total de fosfolipídios da membrana
Fosfatidiletanolamina	30
Fosfatidilcolina	27
Esfingomielina	23
Fosfatidilserina	15
Fosfatidilinositol	5
Fosfatidilinositol-4-fosfato	
Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato	
Ácido fosfatídico	

Figura 12-5 – Distribuição assimétrica dos fosfolipídios entre as monocamadas interna e externa da membrana plasmática do eritrócito. A distribuição de um fosfolipídio específico é determinada tratando-se a célula intacta com fosfolipase C, que não alcança os lipídios na monocamada interna, mas remove os grupos cabeça dos lipídios na monocamada externa. (Outros reagentes impermeáveis à membrana podem também ser usados, veja Fig. 12-9.) A proporção de cada grupo cabeça liberado fornece uma estimativa da fração de cada lipídio na monocamada externa.

Os lipídios de membrana estão em movimentação constante

Embora a estrutura da bicamada de lipídio em si seja estável, as moléculas individuais dos fosfolipídios e dos esteróis apresentam grande liberdade de movimentação no plano da membrana (Fig. 12-6). O interior da bicamada é fluido; cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos individualizados estão em movimentação constante, produzidas pela rotação em torno das ligações carbono-carbono das longas cadeias de acilas laterais. O grau de fluidez depende da composição lipídica e da temperatura. Em temperaturas baixas, relativamente ocorre pouca movimentação lipídica e a bicamada existe em uma forma quase cristalina (paracristalina). Acima de uma certa temperatura, os lipídios podem apresentar grande movimentação. A **temperatura de transição**, temperatura acima da qual o sólido paracristalino se modifica para fluido, é característica para cada membrana e depende de sua composição lipídica. Ácidos graxos saturados se acondicionam bem em um conjunto paracristalino; entretanto, as dobras dos ácidos graxos insaturados (veja Fig. 11-1) interferem nesse acondicionamento e previnem a formação de um estado paracristalino sólido. Quanto maior a proporção dos ácidos graxos saturados, maior a temperatura de transição da membrana.

O conteúdo esterol da membrana também é um determinante importante dessa temperatura de transição. A estrutura plana e rígida do núcleo esteróide, inserida entre as cadeias laterais dos ácidos graxos, tem dois efeitos na fluidez. Abaixo da temperatura de transição da membrana, a inserção do esterol previne o empacotamento ordenado das cadeias dos ácidos graxos e, portanto, aumenta a fluidez da membrana. Acima do ponto de transição térmica, o sistema rígido do anel do esterol reduz a liberdade de as cadeias vizinhas de ácidos graxos se movimentarem pela rotação em torno das ligações carbono-carbono e, portanto, reduz a fluidez no centro da bicamada. Os esteróis, portanto, tendem a moderar os extremos de solidez e fluidez das membranas.

As células regulam sua composição de lipídios de forma a alcançar uma fluidez constante em várias condições de crescimento. Por exemplo, quando cultivadas em baixas temperaturas, as bactérias sintetizam mais ácidos graxos insaturados e poucos saturados do que quando cultivadas em altas temperaturas (Tabela 12-2). Como resultado desse ajustamento na composição lipídica, as membranas das bactérias cultivadas em baixas ou altas temperaturas possuem mais ou menos o mesmo grau de fluidez.

Tabela 12-2 – Composição de ácidos graxos das células de *E. coli* cultivadas em diferentes temperaturas

	Porcentagem dos ácidos graxos totais*			
	10°C	**20°C**	**30°C**	**40°C**
Mirístico (14:0)	4	4	4	8
Palmítico (16:0)	18	25	29	48
Palmitoléico (16:1)	26	24	23	9
Oléico (18:1)	38	34	30	12
Hidroximirístico	13	10	10	8
Relação insaturado/saturado[†]	2,9	2,0	1,6	0,38

Fonte: Dados de Marr AG & Ingraham JL. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 1260.

* A composição exata de ácidos graxos depende não apenas da temperatura de crescimento, mas também da etapa de crescimento e da composição do meio de crescimento.

[†] Calculada como a porcentagem total de 16:1 mais 18:1, dividida pela porcentagem total de 14:0 mais 16:0. O ácido hidroximirístico foi omitido desses cálculos.

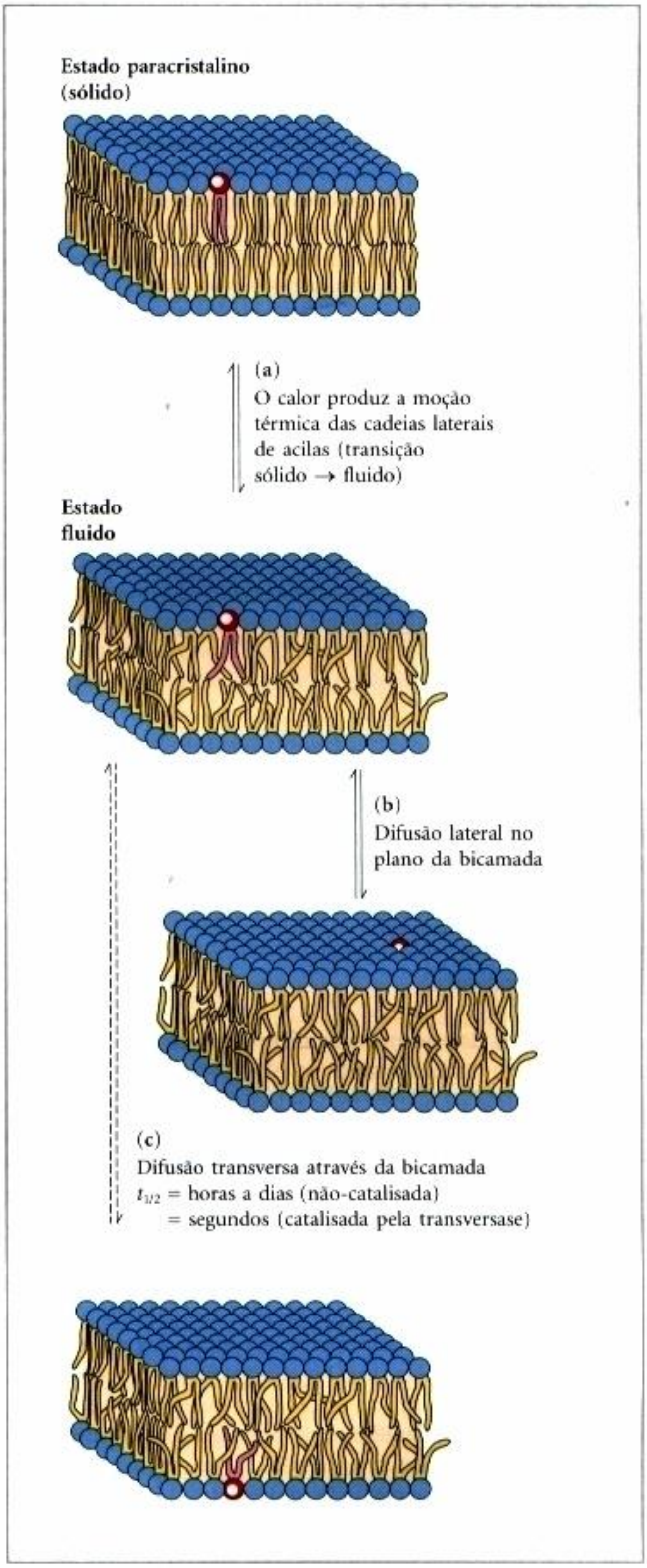

Estado paracristalino (sólido)
(a)
O calor produz a moção térmica das cadeias laterais de acilas (transição sólido → fluido)
Estado fluido
(b)
Difusão lateral no plano da bicamada
(c)
Difusão transversa através da bicamada
$t_{1/2}$ = horas a dias (não-catalisada)
= segundos (catalisada pela transversase)

Figura 12-6 – A movimentação dos lipídios da membrana. A movimentação lipídica em uma bicamada inclui: (**a**) a movimentação térmica dos grupos de acilas graxas no interior da bicamada e (**b**) a difusão lateral de moléculas individuais em uma face da bicamada. Uma única molécula de lipídio pode difundir-se de uma extremidade à outra de uma célula da *E. coli* em cerca de 1 segundo a 37°C. Por causa da movimentação térmica, a bicamada é fluida acima de uma certa temperatura de transição; assim que a temperatura diminui, os lipídios tornam-se paracristalinos. (**c**) A movimentação individual de lipídios entre as duas faces da bicamada (a difusão transversa) é muito lenta, a menos que catalisada por um transportador de lipídio específico, a transversase. A distribuição, ao acaso, dos lipídios entre as duas monocamadas demora horas se não catalisada, mas apenas segundos quando a transversase está presente.

Um segundo tipo de movimentação lipídica envolve não apenas a flexão das cadeias de acilas graxas, mas também a movimentação de uma molécula inteira de lipídio em relação a seus vizinhos (Fig. 12-6b). Uma molécula em uma monocamada, ou face, da bicamada de lipídio — a face externa da membrana plasmática do eritrócito, por exemplo — pode difundir-se lateralmente de modo tão rápido que ela circunscreve o eritrócito em segundos. Essa rápida difusão lateral no plano da bicamada torna aleatória as posições de moléculas individuais em apenas alguns segundos. A combinação da flexão com a difusão lateral da cadeia de acila produz uma bicamada de membrana com as propriedades de um cristal líquido: um alto grau de regularidade em uma dimensão (perpendicular à bicamada) e uma grande mobilidade na outra (o plano da bicamada).

Uma terceira espécie de movimentação lipídica, muito menos provável que a movimentação conformacional ou de difusão lateral, é a difusão transmembrana, ou difusão transversa, de uma molécula de uma face da bicamada para a outra (Fig. 12-6c). Essa movimentação requer que um grupo cabeça polar (e possivelmente carregado) deixe seu ambiente aquoso e se mova para o interior hidrofóbico da bicamada, um processo com uma variação de energia livre altamente positiva. Apesar disso, esse evento altamente endergônico é algumas vezes necessário, por exemplo, durante a síntese da membrana plasmática bacteriana, quando os fosfolipídios produzidos na superfície interna da membrana precisam sofrer uma difusão transversa para entrar na face externa da bicamada. Difusão transmembrana semelhante precisa também ocorrer nas células eucarióticas, à medida que os lipídios de membrana sintetizados em um compartimento se movimentam para outras organelas. Uma família de proteínas (transversase) facilita a difusão transversa, fornecendo uma via transmembrana que é energeticamente mais favorável que a difusão não-catalisada.

As proteínas de membrana difundem-se lateralmente na bicamada

Muitas proteínas de membrana comportam-se como se estivessem flutuando em um mar de lipídios. Da mesma forma que os lipídios de membrana, essas proteínas são livres para se difundirem lateralmente no plano da bicamada e estão em constante movimentação, como mostrado pelo experimento esquematizado na Figura 12-7. Algumas proteínas de membrana se associam para formar grandes agregados ("patches") na superfície de uma célula ou organela, onde as moléculas protéicas individuais não se movem relativamente às outras; por exemplo, os receptores da acetilcolina (veja Fig. 12-39) formam densos agregados nas membranas plasmáticas do neurônio, nas sinapses. Outras proteínas de membrana são ancoradas às estruturas internas que previnem sua livre difusão. Na membrana do eritrócito, tanto a glicoforina quanto a proteína trocadora de cloreto-bicarbonato (pág. 320) são amarradas a uma proteína filamentosa do citoesqueleto, a espectrina (Fig. 12-8).

Algumas proteínas de membrana atravessam a bicamada de lipídios

Moléculas de proteínas individuais ou complexos multiprotéicos das membranas biológicas podem ser visualizados pela microscopia eletrônica da criofratura (Adendo 12-1). Algumas proteínas aparecem apenas em uma face da membrana; outras que atravessam a espessura total da bicamada se projetam nas superfícies da membrana, tanto interna quanto externa. Entre estas últimas estão as proteínas que conduzem solutos ou sinais através da membrana.

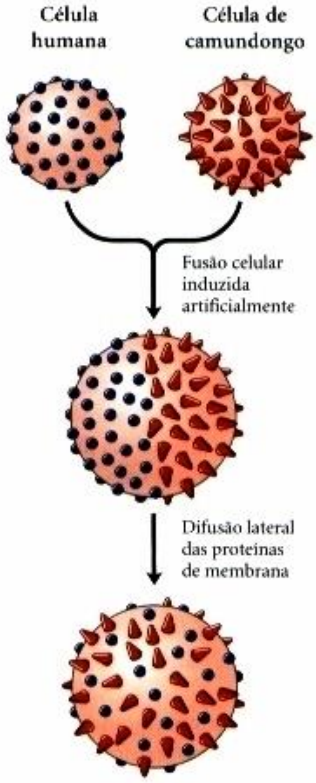

Célula humana
Célula de camundongo
Fusão celular induzida artificialmente
Difusão lateral das proteínas de membrana

Figura 12-7 – Demonstração da difusão lateral das proteínas de membrana. A fusão de uma célula de camundongo com uma célula humana resulta na distribuição aleatória das proteínas das membranas das duas células. Depois da fusão, a localização de cada tipo de proteína de membrana é determinada corando-se células com anticorpos espécie-específicos. Anticorpos anticamundongo e anti-humano são especificamente marcados com moléculas que florescem com cores diferentes. Observados à microscopia fluorescente, os anticorpos coloridos são vistos misturados na superfície da célula híbrida, minutos após a fusão, indicando a rápida difusão lateral das proteínas de membrana na bicamada lipídica.

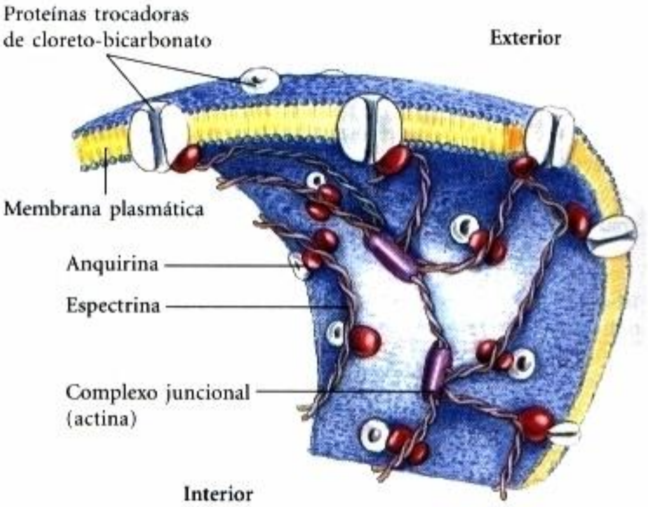

Proteínas trocadoras de cloreto-bicarbonato
Exterior
Membrana plasmática
Anquirina
Espectrina
Complexo juncional (actina)
Interior

Figura 12-8 – Movimentação restrita do trocador cloreto-bicarbonato do eritrócito. A proteína atravessa a membrana e liga-se fortemente à proteína do citoesqueleto — a espectrina — por meio de uma outra proteína — a anquirina —, limitando a mobilidade lateral do trocador. A anquirina é ancorada na membrana pela ligação covalente à cadeia lateral do palmitoil (veja Fig. 12-13). Espectrina, uma proteína filamentosa longa, faz ligações cruzadas no complexo juncional contendo actina. Uma rede de ligações cruzadas de moléculas de espectrina, ligada à face citoplasmática da membrana plasmática, estabiliza a membrana quanto à deformação.

Adendo 12-1 Observando as membranas

A microscopia eletrônica, combinada com técnicas de preparo e coloração de tecidos, tem sido essencial para estudos da estrutura da membrana. Quando cortes finos do tecido são coloridos com tetróxido de ósmio, o qual acentua diferenças na densidade eletrônica, a **microscopia eletrônica de transmissão** mostra a estrutura trilaminar (veja Fig. 12-1). Esse nível de resolução, entretanto, não revela proteínas individuais da membrana. Quando uma amostra de tecido é congelada rapidamente (para evitar a distorção que resulta da formação de cristais de gelo dentro das células) e depois cortada com uma navalha fina, linhas de fratura freqüentemente correm ao longo da superfície da membrana ou através de seu centro, dividindo a bicamada em duas monocamadas (Fig. 1). As superfícies expostas por essa técnica de **criofratura** podem ser cobertas com uma fina camada de carbono (evaporada de um eletrodo de carvão sob vácuo). A **microscopia eletrônica de varredura**, resultante da réplica do carbono, mostra detalhes em baixo-relevo da superfície da membrana e a face interna de uma monocamada exposta pela divisão da bicamada (Fig. 2). Uma variedade de partículas com as dimensões de moléculas de proteínas únicas ou complexos protéicos que se projetam de um fundo monótono (a bicamada de lipídio). Em muitas membranas, as partículas são posicionadas aleatoriamente, mas, em regiões especializadas tais como a membrana pós-sináptica, elas estão agregadas e orientadas. Na bainha de mielina, as partículas estão distribuídas esparsamente. Nas membranas ricas em complexos enzimáticos — as membranas tilacóides dos cloroplastos, por exemplo —, a superfície está praticamente cheia de partículas.

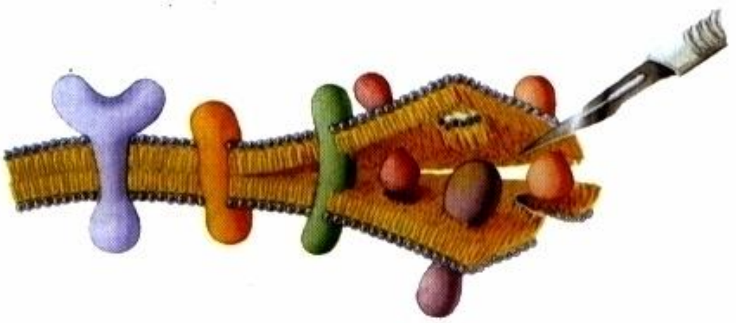


Figura 1 – Divisão de uma bicamada da membrana pela técnica de criofratura.

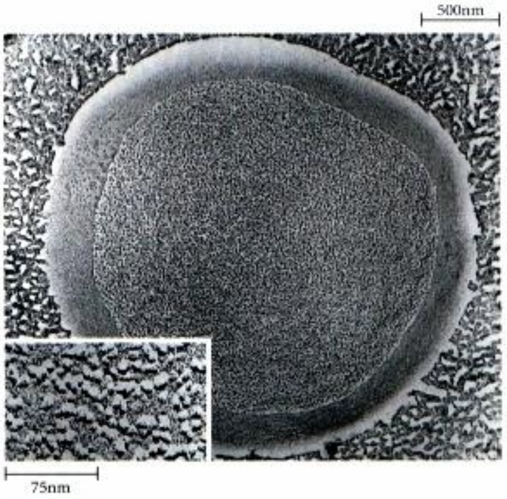


Figura 2 – Uma membrana de eritrócito é congelada em água, entalhada (pela sublimação de água), e uma réplica de carbono é observada ao microscópio eletrônico. A réplica mostra proteínas integrais de membrana como protuberâncias de vários tamanhos e formas, que são mais facilmente visíveis em grande aumento (inserto).

A localização das proteínas de membrana também pode ser investigada com reagentes que reagem com as cadeias laterais das proteínas, mas não conseguem atravessar as membranas (Fig. 12-9). O eritrócito humano é conveniente para tais estudos pelo fato de não ter organelas envoltas por membranas; a membrana plasmática é a única membrana presente. Se uma proteína de membrana em um eritrócito intato reage com um reagente impermeável à membrana (IEA na Fig. 12-9), ele deve ter pelo menos um domínio exposto na face externa (extracelular) da membrana. Proteases, como a tripsina, são incapazes de atravessar as membranas e comumente são usadas para explorar a topologia das proteínas de membrana, a disposição dos domínios protéicos relativos à bicamada de lipídios. A tripsina cliva os domínios extracelulares, mas não afeta os domínios escondidos dentro da bicamada ou expostos apenas na superfície interna.

Experimentos como os descritos na Figura 12-9 mostram que a molécula da glicoforina atravessa a membrana do eritrócito. Seu domínio aminoterminal (contendo o carboidrato) está na superfície externa e pode ser clivado pela tripsina. O carboxiterminal projeta-se para dentro da célula. Tanto o domínio aminoterminal como o carboxiterminal contêm muitos resíduos de aminoácidos polares ou carregados e, portanto, são muito hidrofílicos. Entretanto, um longo segmento no centro da proteína contém principalmente resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Esses achados sugerem que a glicoforina possua um segmento transmembrana arranjado, como mostrado na Figura 12-10.

Um fato adicional pode ser deduzido a partir dos resultados dos experimentos com a glicoforina: sua disposição na membrana é assimétrica. Estudos semelhantes de outras proteínas da membrana mostram que cada uma possui uma orientação específica na bicamada e que as proteínas se reorientam pela difusão transversa muito lentamente. Além disso, as glicoproteínas da membrana plasmática são invariavelmente situadas, com seus resíduos de açúcar, na superfície externa da célula. Como veremos, o arranjo assimétrico das proteínas de membrana resulta em uma assimetria funcional. Todas as moléculas de uma dada bomba iônica, por exemplo, possuem a mesma orientação na membrana e, portanto, bombeiam na mesma direção.

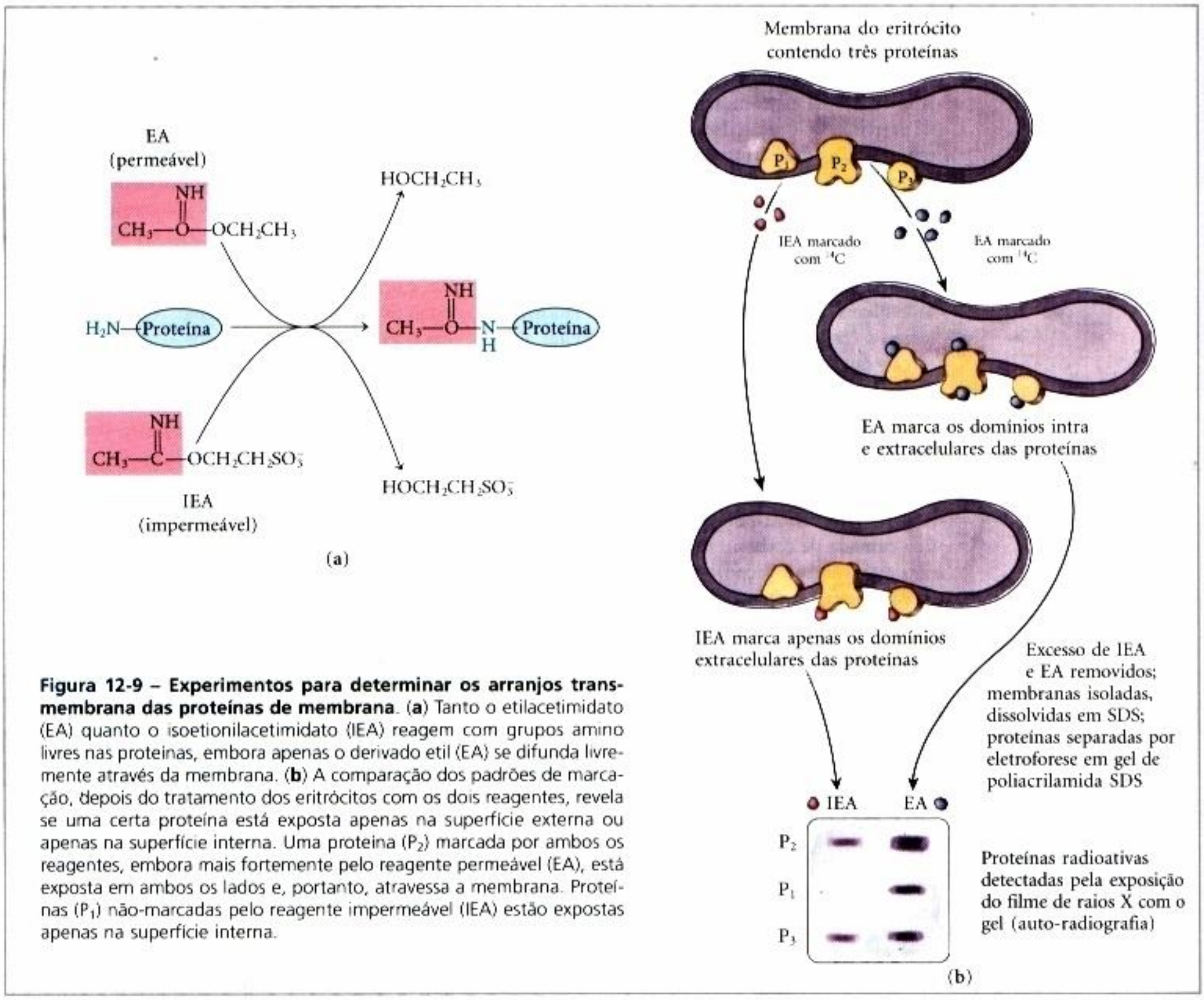

EA
(permeável)
HOCH₂CH₃
OCH₂CH₃
H₂N–Proteína
Proteína
OCH₂CH₂SO₃⁻
HOCH₂CH₂SO₃⁻
IEA
(impermeável)
(a)
Membrana do eritrócito contendo três proteínas
P₁
P₂
P₃
IEA marcado com ¹⁴C
EA marcado com ¹⁴C
EA marca os domínios intra e extracelulares das proteínas
IEA marca apenas os domínios extracelulares das proteínas
Excesso de IEA e EA removidos; membranas isoladas, dissolvidas em SDS; proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS
IEA
EA
P₂
P₁
P₃
Proteínas radioativas detectadas pela exposição do filme de raios X com o gel (auto-radiografia)
(b)

Figura 12-9 – Experimentos para determinar os arranjos transmembrana das proteínas de membrana. (**a**) Tanto o etilacetimidato (EA) quanto o isoetionilacetimidato (IEA) reagem com grupos amino livres nas proteínas, embora apenas o derivado etil (EA) se difunda livremente através da membrana. (**b**) A comparação dos padrões de marcação, depois do tratamento dos eritrócitos com os dois reagentes, revela se uma certa proteína está exposta apenas na superfície externa ou apenas na superfície interna. Uma proteína (P_2) marcada por ambos os reagentes, embora mais fortemente pelo reagente permeável (EA), está exposta em ambos os lados e, portanto, atravessa a membrana. Proteínas (P_1) não-marcadas pelo reagente impermeável (IEA) estão expostas apenas na superfície interna.

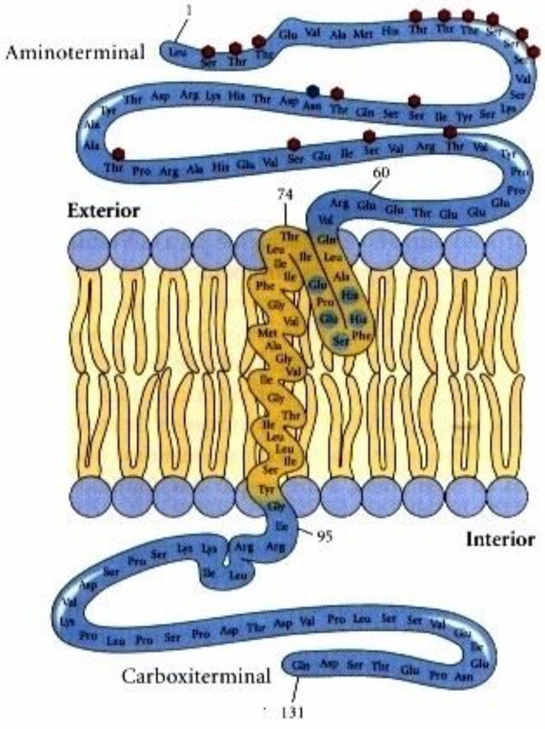

1
Aminoterminal
60
74
Exterior
95
Interior
Carboxiterminal
131

Figura 12-10 – Disposição transbicamada da glicoforina no eritrócito. Um domínio hidrofílico, contendo todos os resíduos de açúcar, está na superfície externa, e um outro domínio hidrofílico se projeta da superfície interna da membrana. O hexágono vermelho representa um tetrassacarídeo (contendo dois Neu5Ac — ácido siálico —, Gal e GalNAc) *O*-ligados a um resíduo de Ser ou Thr; o hexágono azul representa uma cadeia oligossacarídica *N*-ligada a um resíduo de Asn. Um segmento de 19 resíduos hidrofóbicos (resíduos de 75 a 93) forma uma α-hélice que atravessa a bicamada da membrana (veja Fig. 12-17a). O segmento do resíduo 64 ao 74 possui alguns resíduos hidrofóbicos e provavelmente penetra na superfície externa da bicamada lipídica.

As proteína periféricas de membrana são facilmente solubilizadas

As proteínas de membrana podem ser divididas em dois grupos operacionais (Fig. 12-11). Proteínas **integrais** (intrínsecas) são muito firmemente associadas com a membrana, removíveis apenas com agentes que interferem nas interações hidrofóbicas, como detergentes, solventes orgânicos ou desnaturantes. Proteínas **periféricas** (extrínsecas) associam-se com as membranas por meio de interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio com os domínios hidrofílicos das proteínas integrais e com os grupos cabeça polares dos lipídios de membrana. Elas podem ser liberadas por tratamentos relativamente brandos, os quais interferem com as interações eletrostáticas ou quebram pontes de hidrogênio. As proteínas periféricas podem funcionar como reguladoras de enzimas ligadas a membranas ou limitar a mobilidade de proteínas integrais amarrando-as a estruturas intracelulares.

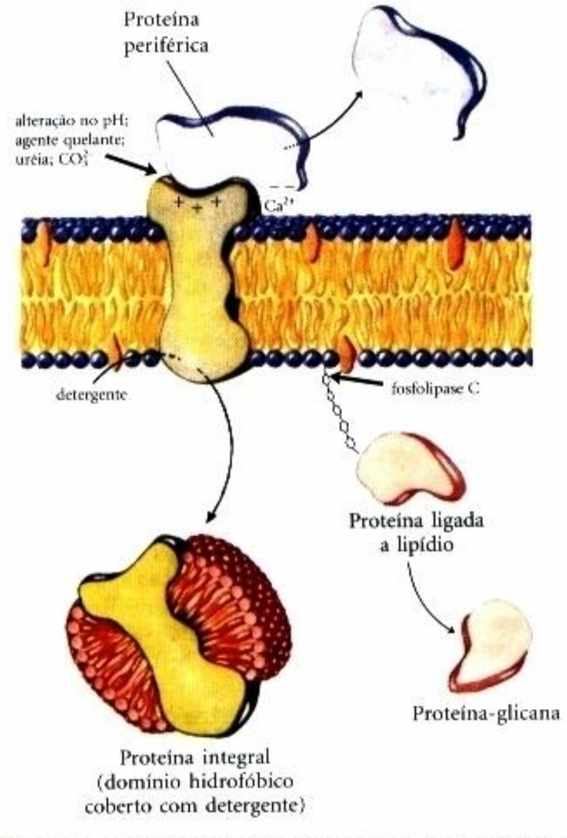

Proteína periférica
alteração no pH; agente quelante; uréia; CO_3^{2-}
Ca^{2+}
detergente
fosfolipase C
Proteína ligada a lipídio
Proteína-glicana
Proteína integral (domínio hidrofóbico coberto com detergente)

Figura 12-11 – Proteínas periféricas e integrais. As proteínas de membrana podem ser operacionalmente distinguidas pelas condições requeridas para liberá-las da membrana. A maioria das proteínas periféricas pode ser liberada por alterações no pH ou na força iônica, remoção do Ca^{2+} por um agente quelante, ou adição de uréia ou carbonato. As proteínas periféricas que se ligam covalentemente a um lipídio de membrana, como o glicosilfosfatidilinositol (veja Fig. 12-13), podem ser liberadas pelo tratamento com a fosfolipase C. Proteínas integrais podem ser extraídas com detergentes, os quais rompem as interações hidrofóbicas com a bicamada lipídica e formam agregados semelhantes a micelas ao redor das moléculas da proteína individual.

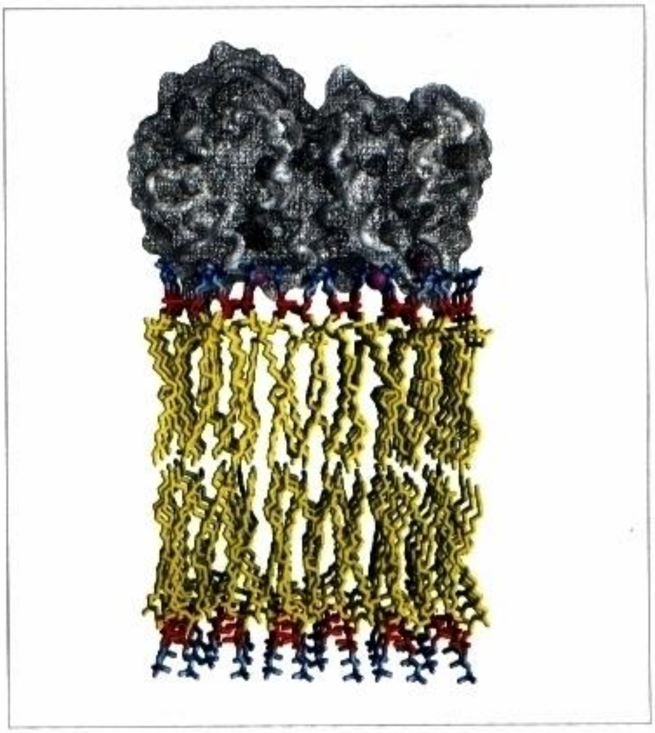


Figura 12-12 – Estrutura proposta da anexina V associada com grupos cabeça polares de uma membrana. Nesta imagem, o esqueleto protéico da anexina V (derivado de estudos cristalográficos) é visto através de uma rede transparente da superfície de contorno. A membrana modelada aqui está composta inteiramente de fosfocolina, com a porção colina mostrada em azul, os grupos fosfato em vermelho e as caudas ácido-graxas em amarelo. As pontes dos íons Ca^{2+} estão em púrpura. Interações eletrostáticas seguram a anexina na membrana.

As anexinas, por exemplo, são uma família de proteínas periféricas da membrana que se ligam reversivelmente a fosfolipídios ácidos de membrana, como aqueles que enriquecem a superfície da membrana plasmática citosólica (interna) e a face citosólica (externa) das organelas. Os íons Ca^{2+}, que interagem simultaneamente com os grupos negativamente carregados da anexina e com as cargas negativas dos grupos cabeça de um fosfolipídio, são essenciais à interação anexina-membrana (Fig. 12-12). Papéis para as várias anexinas têm sido sugeridos na agregação, na fusão de membranas e nas interações entre membranas e elementos do citoesqueleto. Várias outras proteínas que agem na interface membrana–solução aquosa (proteínas da coagulação do sangue, por exemplo) também sofrem uma ligação reversível e dependente de Ca^{2+}, talvez por um mecanismo semelhante.

Lipídios covalentemente ligados se ancoram em algumas proteínas periféricas de membrana

Algumas proteínas de membrana contêm um ou mais lipídios de vários tipos ligados covalentemente: ácidos graxos de cadeia longa, isoprenóides, derivados glicosilados dos fosfatidilinositóis, GPI (Fig. 12-13). Os lipídios ligados fornecem uma âncora hidrofóbica, a qual se insere dentro da bicamada de lipídios e mantém a proteína na superfície da membrana. A força de interação hidrofóbica entre a bicamada e uma única cadeia hidrocarbonada ligada a uma proteína é apenas suficiente para ancorar a proteína seguramente. Outras interações, como atrações iônicas entre as cargas positivas de resíduos carregados de Lys na proteína e cargas negativas de grupos cabeça de lipídios, provavelmente estabilizam a ligação. A associação dessas proteínas ligadas a lipídios com a membrana é certamente mais fraca do que aquela para as proteínas integrais de membrana, e, em pelo menos alguns casos, é reversível.

Além de ancorar uma proteína na membrana, o lipídio de ligação pode ter um papel mais específico. Na membrana plasmática, proteínas com âncora GPI estão exclusivamente na face externa (extracelular), enquanto outros tipos de proteínas ligadas a lipídios (Fig. 12-13) são encontrados exclusivamente na face interna (citosólica). Nas células epiteliais, proteínas de membranas

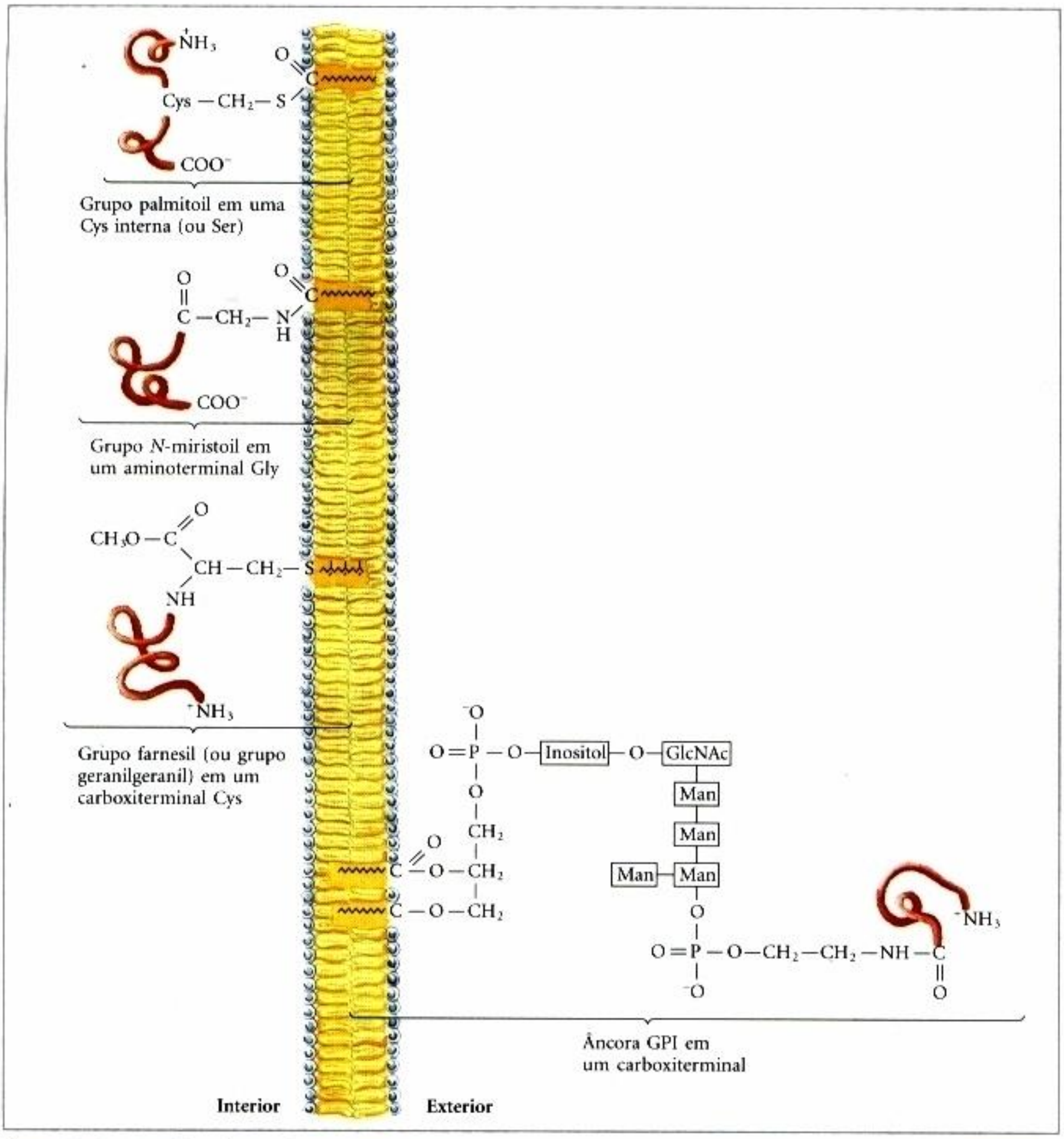

NH₃
O
C
Cys — CH₂— S
COO⁻
Grupo palmitoil em uma Cys interna (ou Ser)
O
C — CH₂— N
H
O
C
COO⁻
Grupo N-miristoil em um aminoterminal Gly
O
CH₃O — C
CH — CH₂— S
NH
NH₃
Grupo farnesil (ou grupo geranilgeranil) em um carboxiterminal Cys
⁻O
O = P — O
Inositol
O
GlcNAc
Man
Man
Man
Man
O
CH₂
C — O — CH₂
C — O — CH₂
O
O = P — O — CH₂ — CH₂ — NH — C
⁻O
O
NH₃
Âncora GPI em um carboxiterminal
Interior
Exterior

Figura 12-13 – Proteínas de membrana ligadas a lipídios. Lipídios covalentemente ligados a proteínas de membranas ancoram proteínas à bicamada lipídica. Um grupo palmitoil é mostrado ligado, por uma ligação tioéster, a um resíduo de cisteína, um grupo *N*-miristoil é geralmente ligado a um grupo aminoterminal Gly; grupos farnesil e geranilgeranil ligados a resíduos carboxiterminal Cys são isoprenóides de 15 e 20 átomos de carbono, respectivamente. Estas três montagens lipídio-proteína são encontradas apenas na superfície interna da membrana plasmática. Âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) são derivadas do fosfatidilinositol no qual o inositol possui um oligossacarídio curto covalentemente ligado a um resíduo carboxiterminal de uma proteína por meio da fosfoetanolamina. Proteínas ligadas a GPI estão sempre na superfície extracelular da membrana plasmática.

ligadas a GPI são muito mais comuns na superfície apical (superfície voltada para o ambiente externo ou para a cavidade interior) do que na superfície basal (a camada epitelial inferior adjacente). A ligação de um lipídio específico a uma proteína de membrana pode ter, portanto, uma função de direcionamento, dirigindo a proteína recém-sintetizada à sua correta localização na membrana. A associação de proteínas ligadas a lipídios com a membrana pode ser mediada por receptores específicos de membrana.

Proteínas integrais são mantidas na membrana por interações hidrofóbicas com lipídios

A firme ligação das proteínas integrais às membranas é o resultado de interações hidrofóbicas entre os lipídios da membrana e os domínios hidrofóbicos das proteínas. Algumas proteínas possuem em uma seqüência hidrofóbica única no meio da proteína (a glicoforina, por exemplo) ou nos amino ou carboxiterminais. Outras possuem seqüências hidrofóbicas múltiplas, cada uma suficientemente longa para atravessar a bicamada lipídica (Fig. 12-14) quando na conformação α-helicoidal. As mesmas técnicas que nos permitiram determinar as estruturas tridimensionais de muitas proteínas solúveis podem, em princípio, ser aplicadas às proteínas de membrana. Entretanto, as técnicas geralmente úteis para cristalizar as proteínas de membrana foram apenas recentemente desenvolvidas, e relativamente poucas estruturas de proteínas de membrana foram resolvidas cristalograficamente.

Uma das proteínas que atravessam a membrana mais bem estudadas, a bacteriorrodopsina, possui sete seqüências internas muito hidrofóbicas e atravessa a bicamada sete vezes. A bac-

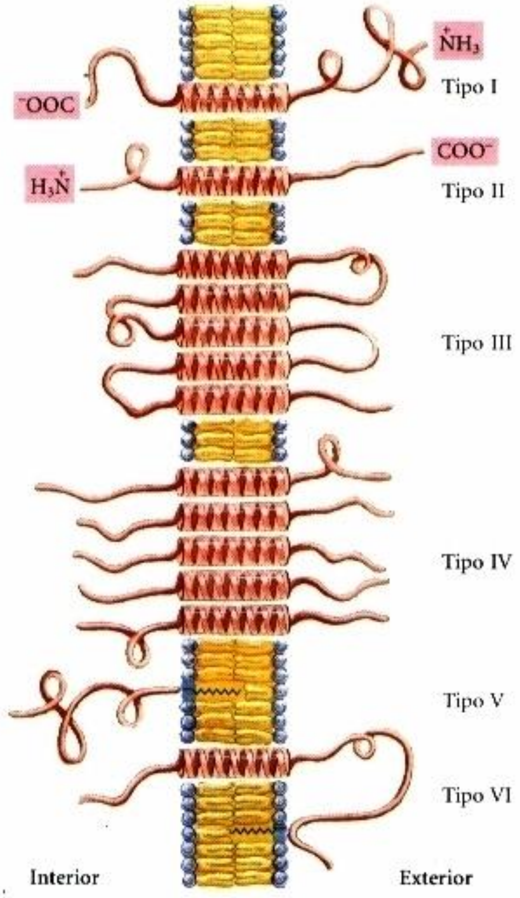


Figura 12-14 – Proteínas de membrana integrais. Para as proteínas das membranas plasmáticas conhecidas, as relações espaciais dos domínios protéicos na bicamada lipídica pertencem a seis categorias. Os tipos I e II possuem apenas uma hélice transmembrana; o domínio aminoterminal está fora da célula nas proteínas do tipo I e dentro nas do tipo II. As proteínas do tipo III possuem múltiplas hélices transmembrana em um único polipeptídeo. Nas proteínas do tipo IV, os domínios transmembrana de vários polipeptídeos diferentes se montam para formar um canal através da membrana. As proteínas do tipo V são seguras à bicamada principalmente pelos lipídios covalentemente ligados (veja Fig. 12-13), e as proteínas do tipo VI possuem tanto hélices transmembrana como âncoras (GPI) lipídicas.

Nesta figura, e em outras ao longo deste livro, representamos os segmentos protéicos transmembrana em suas conformações mais prováveis: como hélices de seis ou sete voltas. Algumas vezes, essas hélices serão mostradas simplesmente como cilindros. Como relativamente poucas estruturas das proteínas de membrana foram deduzidas por cristalografia de raios X, nossa representação dos domínios extramembrana é arbitrária e não necessariamente em escala, a menos que seja especificamente apontado.

teriorrodopsina é uma bomba de prótons acionada pela luz, densamente empacotada em conjuntos regulares na membrana púrpura da bactéria *Halobacterium halobium.* Quando esses conjuntos são vistos de vários ângulos ao microscópio eletrônico, a imagem resultante permite uma reconstrução tridimensional da molécula da bacteriorrodopsina. A cristalografia de raios X produz uma estrutura semelhante em todas as características essenciais (Fig. 12-15). Sete segmentos α-hélices, cada um atravessando a bicamada lipídica, estão conectados por alças não-helicoidais na superfície interna ou externa da membrana. Na seqüência de aminoácidos da bacteriorrodopsina, podem ser identificados sete segmentos com cerca de 20 resíduos hidrofóbicos, cada segmento suficientemente longo para fazer uma α-hélice atravessar a bicamada lipídica. As interações hidrofóbicas entre os aminoácidos não-polares e as cadeias de acilas laterais dos lipídios da membrana ancoram firmemente a proteína na membrana. As sete hélices são agrupadas juntas e orientadas quase perpendicularmente ao plano da bicamada, fornecendo uma via transmembrana para a translocação do próton. Como veremos no Capítulo 13, esse padrão de sete hélices que atravessam a membrana é um motivo comum nas proteínas de membrana envolvidas na recepção de sinais.

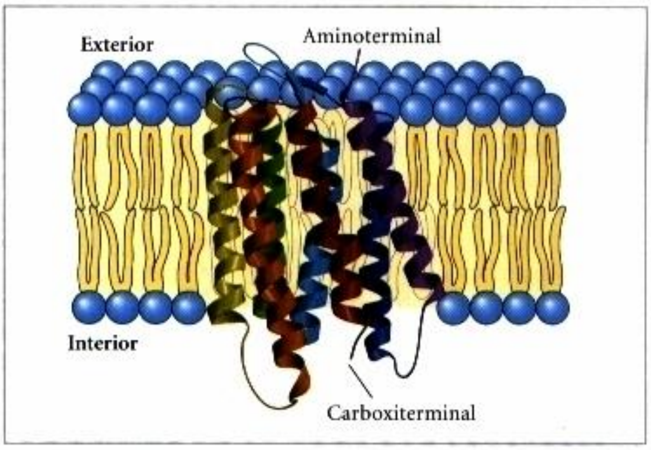


Figura 12-15 – Bacteriorrodopsina, uma proteína que atravessa a membrana. A cadeia polipeptídica única da bacteriorrodopsina dobra-se em sete α-hélices hidrofóbicas, cada uma atravessando a bicamada lipídica quase perpendicularmente ao plano da membrana. As sete hélices transmembrana estão agrupadas e o espaço ao redor e entre elas está preenchido com as cadeias de acilas dos lipídios de membrana. O pigmento retinal, que absorve a luz (veja Fig. 11-19), está profundamente escondido na membrana em contato com vários dos segmentos helicoidais (não mostrado). As hélices estão coloridas para corresponder com o gráfico de hidropatia apresentado na Figura 12-17b.

O centro de reação fotossintético de uma bactéria púrpura foi a primeira estrutura de proteína de membrana resolvida pela cristalografia. Embora seja uma proteína de membrana mais complexa do que a bacteriorrodopsina, ela é construída com os mesmos princípios estruturais. O centro de reação possui quatro subunidades protéicas, três das quais contêm segmentos α-hélices que atravessam a membrana (Fig. 12-16). Esses segmentos são ricos em aminoácidos não-polares, com suas cadeias laterais hidrofóbicas orientadas para fora da molécula, onde elas interagem com os lipídios da membrana. A arquitetura do centro de reação é, portanto, o inverso da vista na maioria das proteínas solúveis em água, em que os resíduos hidrofóbicos são escondidos dentro do centro da proteína e os resíduos hidrofílicos encontram-se na superfície (lembre-se das estruturas da mioglobina e hemoglobina, por exemplo). No Capítulo 19 encontraremos várias proteínas de membrana complexas, possuindo múltiplos segmentos helicoidais transmembrana, nos quais as cadeias hidrofóbicas estão posicionadas para interagir com a bicamada lipídica.

A topologia de uma proteína integral de membrana pode algumas vezes ser predita a partir da sua seqüência

Determinar a estrutura tridimensional de uma proteína de membrana ou sua topologia é geralmente muito mais difícil do que determinar sua seqüência de aminoácidos, que pode ser conseguida pelo seqüenciamento da proteína ou de seu gene. Mais de um milhar de seqüências são conhecidas entre as proteínas de membrana, mas relativamente poucas estruturas tridimensionais.

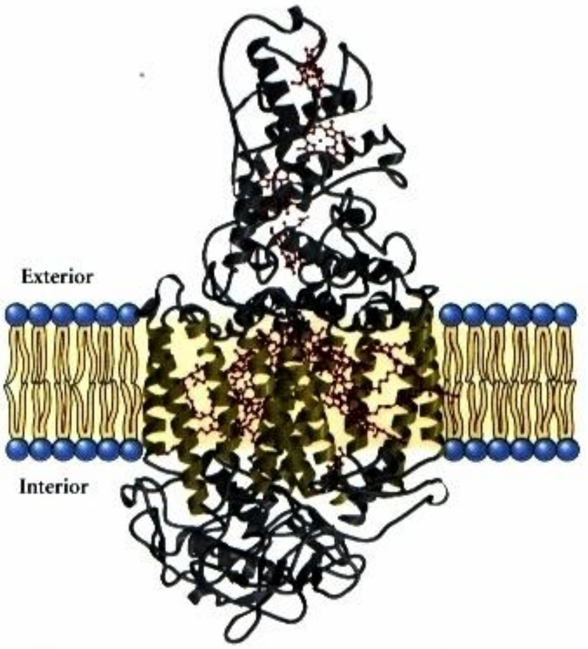
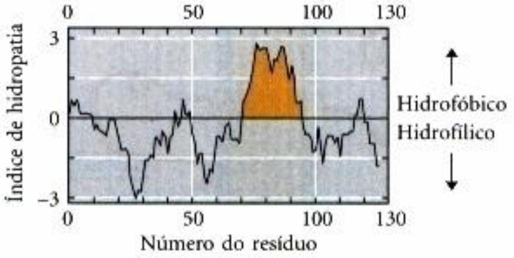


Figura 12-16 – Estrutura tridimensional do centro de reação fotossintético da *Rhodopseudomonas viridis*, uma bactéria púrpura. Esta foi a primeira proteína de membrana integral a ter sua estrutura atômica determinada pelos métodos de difração dos raios X. Onze segmentos α-helicoidais, de três das quatro subunidades, atravessam a bicamada lipídica, formando um cilindro de 45Å (4,5nm) de comprimento; resíduos hidrofóbicos no exterior do cilindro interagem com os lipídios da bicamada. Na representação em fita, os resíduos que são parte das hélices transmembrana são mostrados em amarelo. Os grupos prostéticos (pigmentos que absorvem a luz e os transportadores de elétrons; veja Fig. 19-45) estão em vermelho.

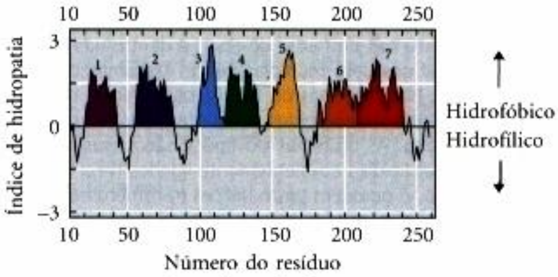
A presença de longas seqüências hidrofóbicas em uma proteína de membrana é comumente considerada como evidência de que essas seqüências atravessam a bicamada lipídica, atuando como âncoras hidrofóbicas ou formando canais transmembrana. Praticamente todas as proteínas integrais possuem pelo menos uma dessas seqüências.

O que podemos predizer sobre a estrutura secundária das porções que atravessam a membrana das proteínas integrais? Uma seqüência α-helicoidal de 20 a 25 resíduos é suficientemente longa para atravessar a espessura (30Å) da bicamada lipídica (lembre-se de que o comprimento de α-hélice é de 1,5Å — 0,15nm — por resíduo de aminoácido). Uma cadeia polipeptídica envolta por lipídios, não possuindo moléculas de água com as quais possa formar pontes de hidrogênio, tende a formar α-hélices ou folhas β, em que as pontes de hidrogênio entre as cadeias é máxima. Se as cadeias laterais de todos os aminoácidos em uma hélice são não-polares, as interações hidrofóbicas com os lipídios circundantes estabilizam ainda mais as hélices.

Vários métodos simples de analisar as seqüências de aminoácidos produzem predições razoavelmente precisas da estrutura secundária das proteínas transmembrana. A polaridade relativa de cada aminoácido foi determinada experimentalmente, medindo-se a variação da energia livre que acompanha a movimentação daquela cadeia lateral do aminoácido de um solvente hidrofóbico para a água. Essa energia livre de transferência oscila de valores muito exergônicos para os resíduos polares ou carregados, até valores muito endergônicos para os aminoácidos com cadeias laterais hidrocarbônicas alifáticas ou aromáticas. O caráter hidrofóbico geral de uma seqüência de aminoácidos é estimado somando-se as energias livres de transferências para aqueles resíduos na seqüência, que produz um **índice de hidropatia** para aquela região (veja Tabela 5-1). Para examinarmos potenciais segmentos atravessadores de membrana em uma seqüência polipeptídica, calculamos o índice de hidropatia para segmentos sucessivos (chamados de janelas) de um determinado tamanho, que pode ser de 7 a 20 resíduos. Para uma janela de sete resíduos, por exemplo, os índices para os resíduos 1 a 7, 2 a 8, 3 a 9, e assim por diante, são representados como na Figura 12-17 (representados os resíduos médios em cada janela — resíduo 4 para a janela 1 a 7, por exemplo). Uma região com mais de 20 resíduos de alto índice de hidropatia é presumivelmente um segmento transmembrana. Quando as seqüências das proteínas de membrana de estrutura tridimensional conhecidas são esquadrinhadas dessa forma, encontramos uma correspondência razoavelmente boa entre os segmentos previstos e os segmentos conhecidos que atravessam a membrana. A análise de hidropatia prediz uma única hélice para a glicoforina (Fig. 12-17a) e sete segmentos transmembrana para a bacteriorrodopsina (Fig. 12-17b) — em concordância com os estudos experimentais.



(a) **Glicoforina**



(b) **Bacteriorrodopsina**

Figura 12-17 – Diagramas de hidropatia. O índice de hidropatia (veja Tabela 5-1) é representado em relação ao número de resíduo para duas proteínas de membrana integrais. O índice de hidropatia para cada aminoácido, numa seqüência de tamanho definido (chamada de janela), é usado para calcular a hidropatia média para os resíduos naquela janela. O eixo horizontal mostra o número do resíduo para o meio da janela. (**a**) A glicoforina dos eritrócitos humanos possui uma seqüência hidrofóbica entre os resíduos 75 e 93; compare com a Figura 12-10. (**b**) A bacteriorrodopsina, conhecida de estudos físicos independentes como tendo sete hélices transmembrana (veja Fig. 12-15), possui sete regiões hidrofóbicas. Observe, entretanto, que o diagrama de hidropatia é ambíguo na região dos segmentos 6 e 7. Estudos físicos confirmaram que essa região possui dois segmentos transmembrana.

Acredita-se que muitas das proteínas de transporte descritas neste capítulo, baseando-se na sua seqüência de aminoácidos e nos diagramas de hidropatia, possuam múltiplas regiões helicoidais que atravessam as membranas — ou seja, elas são proteínas integrais dos tipos III ou IV (Fig. 12-14). Quando as predições são consistentes com os estudos químicos da localização da proteína (tais como àqueles descritos anteriormente para a glicoforina e a bacteriorrodopsina), a suposição de que as regiões hidrofóbicas correspondam aos domínios que atravessam a membrana é mais bem justificada.

Nem todas as proteínas integrais de membrana são compostas de α-hélices transmembrana. Um outro motivo estrutural nas proteínas de membrana é o barril β (veja Fig. 6-20d), em que 20 ou mais segmentos transmembrana formam folhas β que demarcam um cilindro (Fig. 12-18). Os mesmos fatores que favorecem a formação da α-hélice no interior hidrofóbico de uma bicamada lipídica também estabilizam os barris β. Quando moléculas de água não estão disponíveis para formar pontes de hidrogênio com o oxigênio da carbonila e o nitrogênio da ligação peptídica, o pareamento máximo de hidrogênio intracadeias fornece a conformação mais estável. Porinas, proteínas que permitem certos solutos polares atravessarem a membrana externa da parede de bactérias gram-negativas como a *E. coli*, possuem muitos barris β demarcando a passagem polar transmembrana.

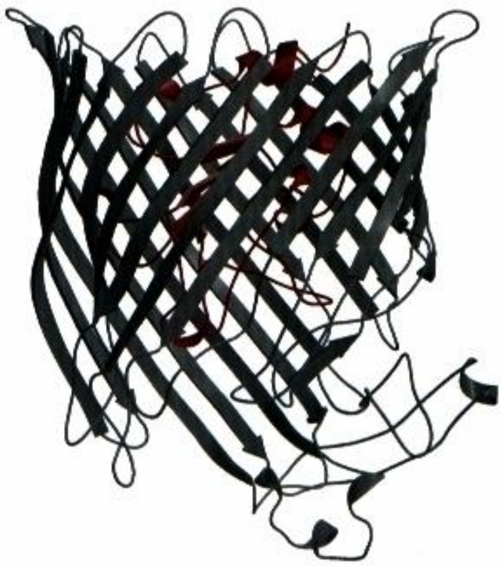


Figura 12-18 – Porina FhuA, uma proteína de membrana integral com a estrutura barril β. Essa proteína da membrana externa da parede da *E. coli* inclui um barril β composto de 22 fitas β antiparalelas (cinza), formando um canal transmembrana através do qual o íon ferro ligado ao transportador ferricromo entra vindo do meio circundante. Os resíduos na superfície externa do barril são hidrofóbicos e interagem com os lipídios e os lipossacarídeos na membrana externa da parede.

Um polipeptídeo é mais estendido na conformação β do que na α-hélice, apenas sete a nove resíduos na conformação β são necessários para atravessar uma membrana. Lembre-se de que, na conformação β, cadeias laterais alternadas se projetam acima e abaixo da folha (veja Fig. 6-7). Nas fitas β das proteínas de membrana, cada segundo resíduo no segmento que atravessa a membrana é hidrofóbico e interage com a bicamada lipídica; as cadeias laterais aromáticas são comumente encontradas na interface lipídio-proteína. Os outros resíduos podem ou não ser hidrofílicos. O diagrama da hidropatia não é útil na previsão de segmentos transmembrana para proteínas com motivos de barril β, mas, à medida que aumentam os dados conhecidos de motivos de barril β, as previsões baseadas nas seqüências de folhas β transmembranas tornam-se mais factíveis.

Proteínas integrais medeiam as interações célula-célula e a adesão

Várias famílias de proteínas integrais na membrana plasmática fornecem pontos específicos de ligação entre células, ou entre uma célula e a matriz protéica extracelular. **Integrinas** são proteínas heterodiméricas (com duas subunidades diferentes, α e β) ancoradas à membrana plasmática por uma única hélice hidrofóbica transmembrana em cada subunidade (Fig. 12-19). Os grandes domínios extracelulares das subunidades α e β combinam-se para formar um sítio de ligação específico para proteínas extracelulares, tais como o colágeno e a fibronectina. Como há pelo menos 14 subunidades α diferentes e pelo menos oito subunidades β diferentes, uma grande variedade de especificidades pode ser gerada a partir de várias combinações de α e β. Um determinante comum à ligação da integrina, presente em vários parceiros extracelulares das integrinas, é a seqüência Arg–Gly–Asp (RGD).

Integrinas não são meramente adesivas; elas funcionam como receptores e transdutores de sinais, carreando informação por meio da membrana plasmática em ambas as direções. As integrinas regulam muitos processos, incluindo a agregação de plaquetas no local de uma ferida, o reparo de tecido, a atividade das células imunes e a invasão do tecido por um tumor (veja Fig. 9-27). Mutação em um gene da integrina codificando a subunidade β conhecida como CD18 é a causa da deficiência de adesão de leucócitos humanos, uma doença genética rara na qual os leucócitos não conseguem passar para fora dos vasos sangüíneos para encontrar os sítios de infecção. Crianças com um defeito grave em CD18 comumente morrem de infecções antes da idade de 2 anos.

Pelo menos três outras famílias de proteínas da membrana plasmática também estão envolvidas na adesão de superfície (Fig. 12-19). **Caderinas** sofrem interações homofílicas ("com a mesma espécie") com caderinas idênticas em uma célula adjacente. **Proteínas semelhantes à imunoglobulina** podem sofrer ou interações homofílicas com suas contrapartidas idênticas em uma outra célula ou interações heterofílicas com uma integrina em uma célula vizinha. **Selectinas** possuem domínios extracelulares que, na presença de Ca^{2+}, ligam-se a polissacarídeos específicos na superfície de uma célula adjacente. Selectinas estão presentes principalmente nos vários tipos de células sangüíneas e nas células endoteliais que forram os vasos sangüíneos. Eles são uma parte essencial dos processos de coagulação do sangue.

Proteínas integrais desempenham um papel em muitos outros processos celulares. Elas funcionam como transportadores e canais iônicos (discutidos posteriormente neste capítulo) e como receptores para hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento (Capítulo 13). Elas são centrais à fosforilação oxidativa e à fotossíntese (Capítulo 19) e ao reconhecimento célula-célula e célula-antígeno no sistema imune (Capítulo 7). Proteínas integrais são também participantes principais na fusão de membranas que acompanha a exocitose, a endocitose e a entrada de muitos tipos de vírus nas células hospedeiras.

A fusão de membranas é central a muitos processos biológicos

Uma característica marcante das membranas biológicas é sua habilidade de sofrer fusão com uma outra membrana sem perder sua integridade. Embora as membranas sejam estáveis, elas não são de forma alguma estáticas. No sistema de endomembranas (veja Fig. 2-19), os compartimentos membranosos constantemente se reorganizam como pequenas vesículas que brotam do complexo de Golgi, transportando lipídios e proteínas

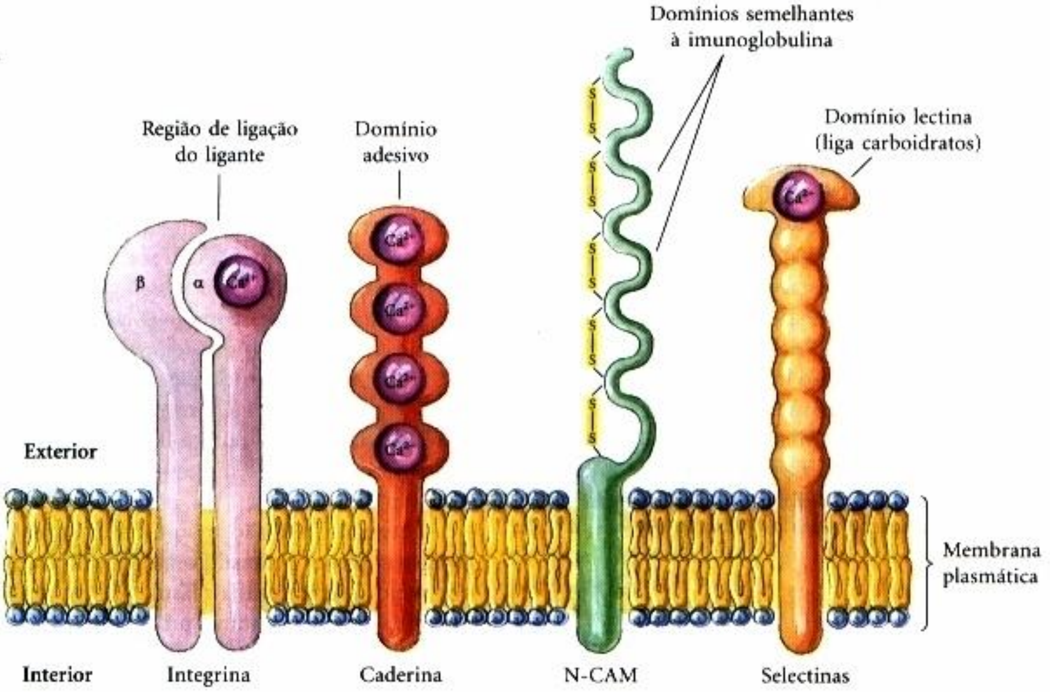

Domínios semelhantes
à imunoglobulina
Região de ligação
do ligante
Domínio
adesivo
Domínio lectina
(liga carboidratos)
β
α
Ca2+
S S
Exterior
Membrana
plasmática
Interior
Integrina
Caderina
N-CAM
Selectinas

Figura 12-19 – Quatro exemplos de proteínas integrais que funcionam nas interações célula-célula. Integrinas consistem de polipeptídeos transmembrana α e β; seus domínios extracelulares se combinam para formar sítios de ligação com íons metálicos divalentes e proteínas da matriz extracelular (tais como o colágeno e a fibronectina) ou proteínas de superfície específicas para outras células. Caderinas possuem quatro domínios de ligação do Ca^{2+} extracelular, o mais distal dos quais contém o sítio que liga a caderina a outra superfície celular. N-CAM (molécula de adesão à célula neuronal, "*neuronal cell adhesion molecule*") é uma de uma família de proteínas semelhantes à imunoglobulina que medeiam interações independentes de Ca^{2+} com proteínas de superfície das células vizinhas. Selectinas ligam-se fortemente às porções carboidrato nas células vizinhas; a ligação é dependente de Ca^{2+}.

recentemente sintetizados para outras organelas e para a membrana celular. A exocitose, a endocitose, a divisão celular, a fusão do óvulo com o espermatozóide e a entrada de um vírus envolto por membranas dentro da célula hospedeira, todas envolvem a reorganização da membrana, na qual a operação fundamental é a fusão de dois segmentos de membrana sem a perda de continuidade (Fig. 12-20).

A fusão específica de duas membranas requer que (1) elas se reconheçam; (2) suas superfícies tornem-se intimamente apostas, o que requer a remoção de moléculas de água associadas com os grupos cabeça polares dos lipídios; (3) suas estruturas bicamada se tornem localmente rompidas; e (4) as duas bicamadas se fundam para formar uma bicamada contínua única. A endocitose mediada por receptor ou a secreção regulada também requer que (5) o processo de fusão seja desencadeado no tempo apropriado ou em resposta a sinais específicos. Proteínas integrais chamadas de **proteínas de fusão** medeiam esses eventos, produzindo um reconhecimento específico e uma distorção local transitória da estrutura da bicamada que favorece a fusão das membranas. (Observe que essas proteínas de fusão não são relacionadas com os produtos de dois genes fundidos, também chamados de proteínas de fusão, como discutido no Capítulo 29.)

Um dos casos mais bem estudados de fusão de membranas ocorre durante a infecção de uma célula hospedeira por um vírus envelopado por membrana, como o vírus da influenza ou o HIV. A infecção pelo vírus da influenza começa com uma proteína integral do envelope do vírus, a proteína de hemaglutinação, que se liga a resíduos de ácido siálico (Neu5Ac) das glicoproteínas ou glicolipídios na membrana plasmática da célula (Fig. 12-21a). A endocitose, então, conduz o vírus para dentro da célula em

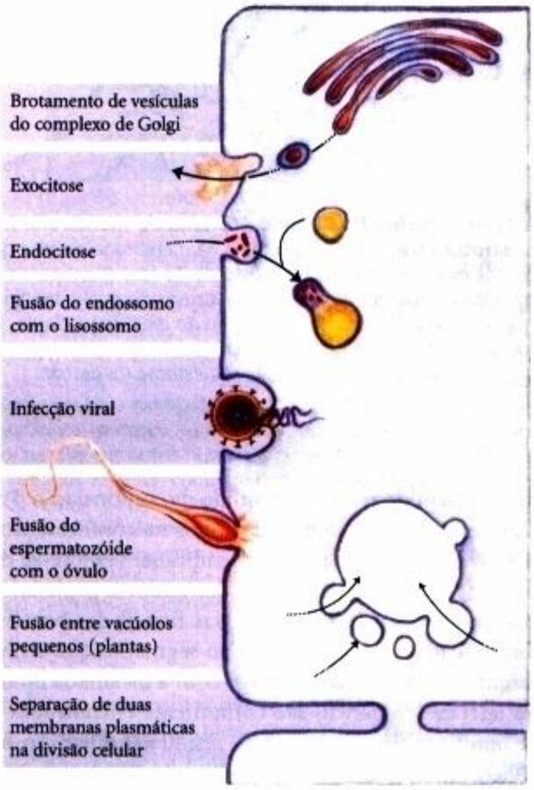
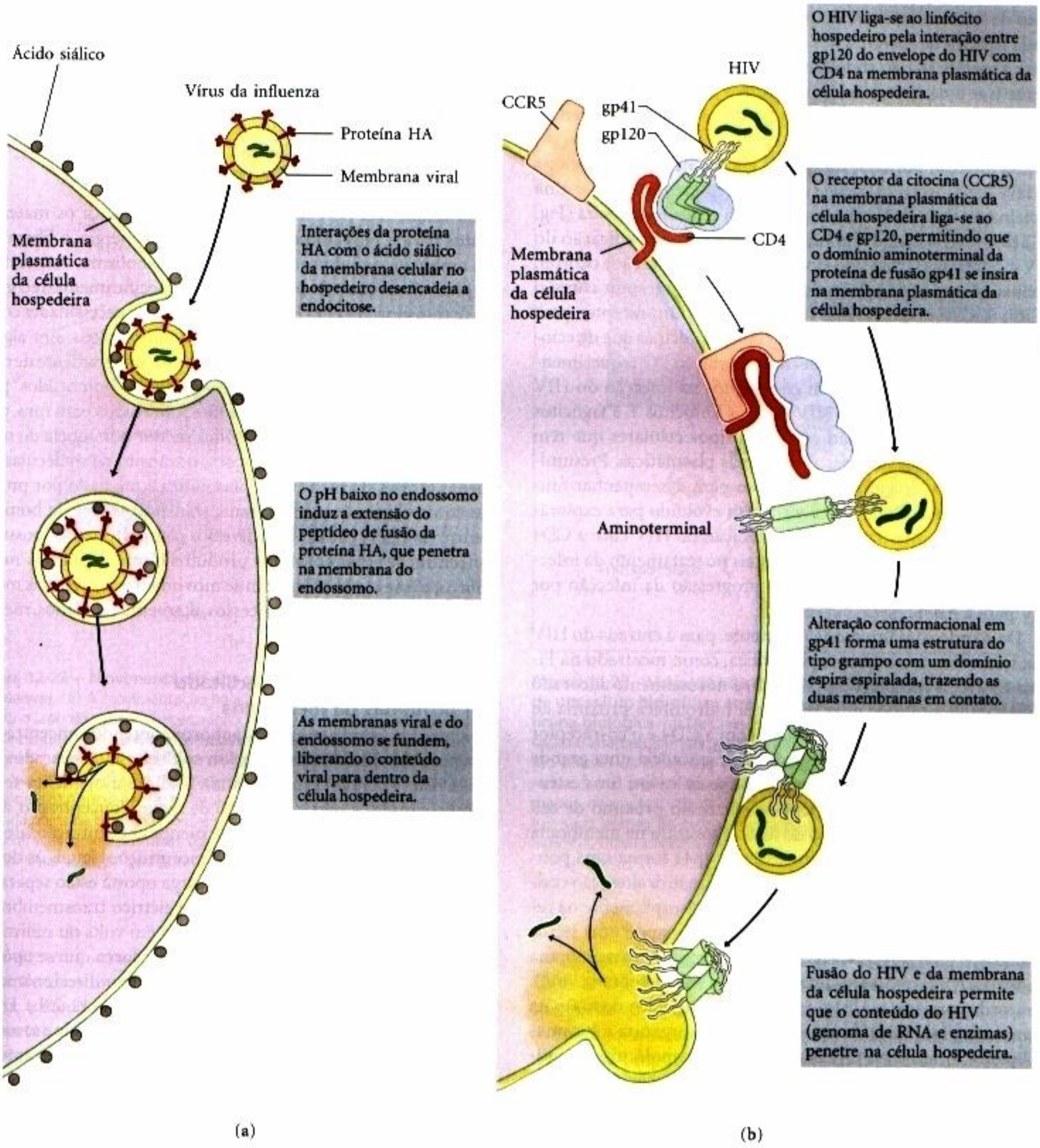

Brotamento de vesículas
do complexo de Golgi
Exocitose
Endocitose
Fusão do endossomo
com o lisossomo
Infecção viral
Fusão do
espermatozóide
com o óvulo
Fusão entre vacúolos
pequenos (plantas)
Separação de duas
membranas plasmáticas
na divisão celular

Figura 12-20 – Fusão de membranas. A fusão de duas membranas é central a uma variedade de processos celulares envolvendo tanto as organelas quanto a membrana plasmática.



Interações da proteína HA com o ácido siálico da membrana celular no hospedeiro desencadeia a endocitose.

O pH baixo no endossomo induz a extensão do peptídeo de fusão da proteína HA, que penetra na membrana do endossomo.

As membranas viral e do endossomo se fundem, liberando o conteúdo viral para dentro da célula hospedeira.

O HIV liga-se ao linfócito hospedeiro pela interação entre gp120 do envelope do HIV com CD4 na membrana plasmática da célula hospedeira.

O receptor da citocina (CCR5) na membrana plasmática da célula hospedeira liga-se ao CD4 e gp120, permitindo que o domínio aminoterminal da proteína de fusão gp41 se insira na membrana plasmática da célula hospedeira.

Alteração conformacional em gp41 forma uma estrutura do tipo grampo com um domínio espira espiralada, trazendo as duas membranas em contato.

Fusão do HIV e da membrana da célula hospedeira permite que o conteúdo do HIV (genoma de RNA e enzimas) penetre na célula hospedeira.

Figura 12-21 – Fusão de membranas durante a entrada viral dentro de uma célula hospedeira. (**a**) O vírus influenza adere às porções carboidrato na superfície das células hospedeiras (veja Fig. 9-29b) e desencadeia a endocitose, que engloba o vírus em um endossomo. Bombas de prótons (pág. 323) acidificam os conteúdos endossômicos, causando uma alteração dependente de pH na estrutura da proteína de hemaglutinação (HA) e assim expondo um peptídeo de fusão hidrofóbico. O peptídeo de fusão penetra na membrana endossômica produzindo a fusão do vírus e das membranas endossômicas, liberando o genoma viral dentro da célula hospedeira. (**b**) Quando o HIV encontra um linfócito T com a CD4 e uma segunda proteína co-receptor (receptor das citocinas) na sua membrana plasmática, o vírus adere à célula por meio de duas glicoproteínas (gp41 e gp120) na sua própria membrana, liberando o conteúdo viral dentro da célula hospedeira. O HIV infecta apenas aquelas células (linfócitos) com CD4 nas suas membranas plasmáticas.

um endossomo. O pH baixo no endossomo desencadeia uma grande alteração na conformação da proteína de hemaglutinação, expondo um peptídeo hidrofóbico curto chamado de peptídeo de fusão. A inserção do peptídeo de fusão dentro da bicamada lipídica da membrana do endossoma produz uma ponte entre a membrana do endossomo e a do vírus. Isso presumivelmente traz uma distorção local de ambas as bicamadas, levando à fusão das membranas e à liberação do conteúdo viral dentro da célula hospedeira.

Na infecção por HIV, um par de glicoproteínas no envelope do HIV (gp41 e gp120) se liga a dois "receptores" — CD4 e uma proteína co-receptora — na superfície da célula hospedeira (Fig. 12-21b). A CD4 sozinha é suficiente para permitir a ligação do HIV à célula, mas, para a fusão (e, portanto, a infecção) ocorrer, a célula hospedeira também precisa ter um co-receptor como o CCR5. (CCR5 normalmente funciona como um receptor para os fatores de crescimento chamados de quimiocinas que direcionam os leucócitos para os locais da inflamação.) O requerimento tanto da CD4 como de um co-receptor na infecção do HIV explica a especificidade do HIV para os linfócitos T e fagócitos do sistema imune; eles são os únicos tipos celulares que têm ambas as proteínas em suas membranas plasmáticas. Presumivelmente, esses "receptores" evoluíram para desempenhar funções úteis para a célula, mas o vírus tem evoluído para explorá-la. Agentes que interfiram com a interação do HIV com a CD4 ou o co-receptor podem provar-se úteis no tratamento da infecção pelo HIV ou na prevenção da progressão da infecção por HIV para a AIDS.

De acordo com um modelo corrente, para a entrada do HIV pela fusão com a membrana plasmática, como mostrado na Figura 12-21b, o complexo gp41-gp120 é normalmente ancorado à membrana viral por uma seqüência hidrofóbica próxima ao carboxiterminal da gp41. O contato com a CD4 e o co-receptor na superfície da célula do hospedeiro desencadeia uma grande alteração conformacional na gp41, que se estica em uma estrutura estendida e expõem o peptídeo de fusão próximo de seu aminoterminal. Esse peptídeo de fusão é inserido na membrana plasmática da célula hospedeira; assim, a gp41 forma uma ponte entre o vírus e a célula. Uma segunda dramática alteração conformacional ocorre agora: a gp41 curva-se abruptamente na região de dobradiça próxima de seu centro, formando uma estrutura do tipo grampo que traz o seu aminoterminal (na membrana plasmática) próximo a seu carboxiterminal (na membrana viral). De acordo com esse modelo, a inserção do peptídeo de fusão na membrana plasmática de alguma forma desorganiza a bicamada lipídica localmente. O realinhamento das moléculas de lipídios nessa região desorganizada resulta na coalescência das duas membranas, e a fusão ocorre.

A fusão de membranas é central também para outros processos celulares, tais como a movimentação de componentes de membranas recém-sintetizados por meio do sistema de endomembranas do retículo endoplasmático passando pelo complexo de Golgi até a membrana plasmática através de vesículas de membranas, e a liberação de proteínas, hormônios ou neurotransmissores por exocitose. As proteínas requeridas para essas fusões de membrana, chamadas de SNAREs, lembram as fusões de proteínas virais em vários aspectos. Os SNAREs (o nome da família deriva dos receptores protéicos associados a sinaptossomos, "*syn*aptosome-*a*ssociated protein *re*ceptors") formam bastões na forma de grampos que trazem juntos os domínios de proteínas ligados à membrana plasmática e às membranas das vesículas. Os SNAREs na face citosólica das vesículas intracelulares são chamadas de v-SNAREs; aquelas nas membranas-alvo ("*t*arget") com as quais as vesículas se fundem são as t-SNAREs. As formas estendidas dos SNAREs, como aquelas das proteínas de fusão virais, apresentam espiras espiraladas, longas regiões nas quais várias α-hélices são espiraladas umas sobre as outras. Essas semelhanças estruturais muito provavelmente refletem uma analogia fundamental nos mecanismos de fusão nos vírus e nas vesículas intracelulares.

Transporte de Soluto através das Membranas

Cada célula viva deve adquirir de sua vizinhança os materiais brutos para a biossíntese e a produção de energia, e liberar ao seu ambiente os subprodutos de seu metabolismo. A membrana plasmática contém proteínas que especificamente reconhecem e transportam para dentro da célula essas necessidades como os açúcares, os aminoácidos e os íons inorgânicos. Em alguns casos, esses compostos são captados contra um gradiente de concentração, carga elétrica, ou ambos — eles são "bombeados" para dentro. Certos outros compostos são bombeados para fora, para manter a sua concentração citosólica menor que àquela do meio circundante. Com poucas exceções, o trânsito de moléculas pequenas através da membrana plasmática é mediado por proteínas como canais transmembrana, transportadores ou bombas. Dentro da célula eucariótica, diversos compartimentos possuem concentrações diferentes dos produtos e intermediários metabólicos, e esses também devem se movimentar através das membranas intracelulares, em processos altamente regulados, mediados por proteínas.

O transporte passivo é facilitado por proteínas da membrana

Quando dois compartimentos aquosos contendo concentrações desiguais de um composto ou íon solúvel estão separados por um divisor permeável (membrana), o soluto movimenta-se por **difusão simples** a partir da região de maior concentração, através da membrana, para a região de menor concentração, até que os dois compartimentos tenham concentrações iguais às do soluto (Fig. 12-22a). Quando íons de carga oposta estão separados por uma membrana, há um gradiente elétrico transmembrana, o **potencial de membrana,** V_m (expresso em volts ou milivolts). Esse potencial de membrana produz uma força que se opõe às movimentações do íon que aumenta o V_m e o direcionamento da movimentação do íon que diminui o V_m (Fig. 12-22b). Dessa forma, a direção para a qual um soluto carregado tende a se mover espontaneamente através de uma membrana depende tanto do gradiente químico (a diferença na concentração do soluto) como do gradiente elétrico (V_m) através da membrana. Juntos, esses dois fatores são referidos como o **gradiente eletroquímico** ou o **potencial eletroquímico.** Esse comportamento dos solutos está de acordo com a segunda lei da termodinâmica: moléculas tendem espontaneamente a assumir a distribuição da maior aleatoridade, ou seja, a entropia aumentará e a energia do sistema será minimizada.

Nos organismos vivos, a difusão simples da maioria dos solutos é impedida por barreiras **permeáveis seletivas** — membranas que separam os compartimentos intracelulares e cercam as células. Para passar através da bicamada lipídica, um soluto carregado ou polar deve desistir de suas interações com as moléculas de água na sua camada de hidratação e, então, difundir cerca de 3nm (30Å) por meio de um solvente (lipídio) no qual estará pouco solúvel (Fig. 12-23). A energia usada para retirar a camada de hidratação e movimentar o composto polar da água

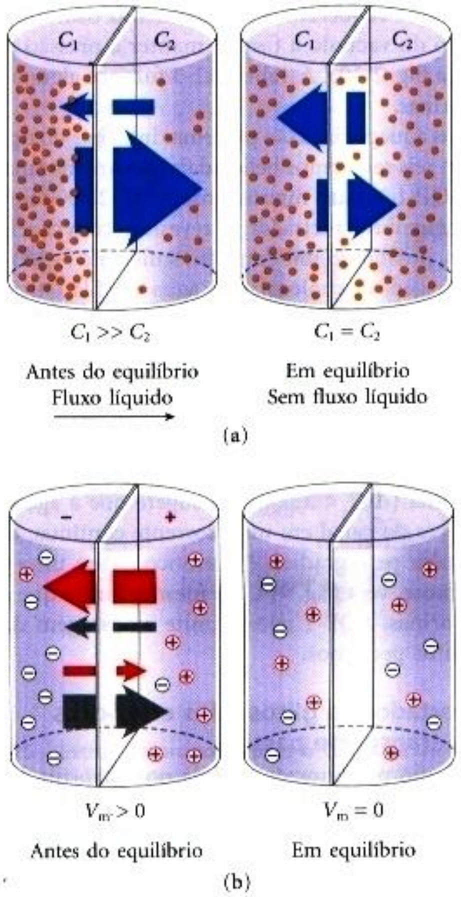


Figura 12-22 – Movimentação dos solutos através uma membrana permeável. (**a**) A movimentação líquida de solutos eletricamente neutros é para o lado de menor concentração até que o equilíbrio seja alcançado. As concentrações do soluto dos lados esquerdo e direito da membrana são designados C_1 e C_2. A velocidade da movimentação transmembrana é proporcional à concentração do gradiente C_1/C_2, como indicado pelas grandes setas. (**b**) A movimentação líquida de solutos carregados eletricamente é ditada por uma combinação dos potenciais elétricos (V_m) e a diferença da concentração química através da membrana; a movimentação líquida do íon continua até que esse potencial eletroquímico alcance valor zero.

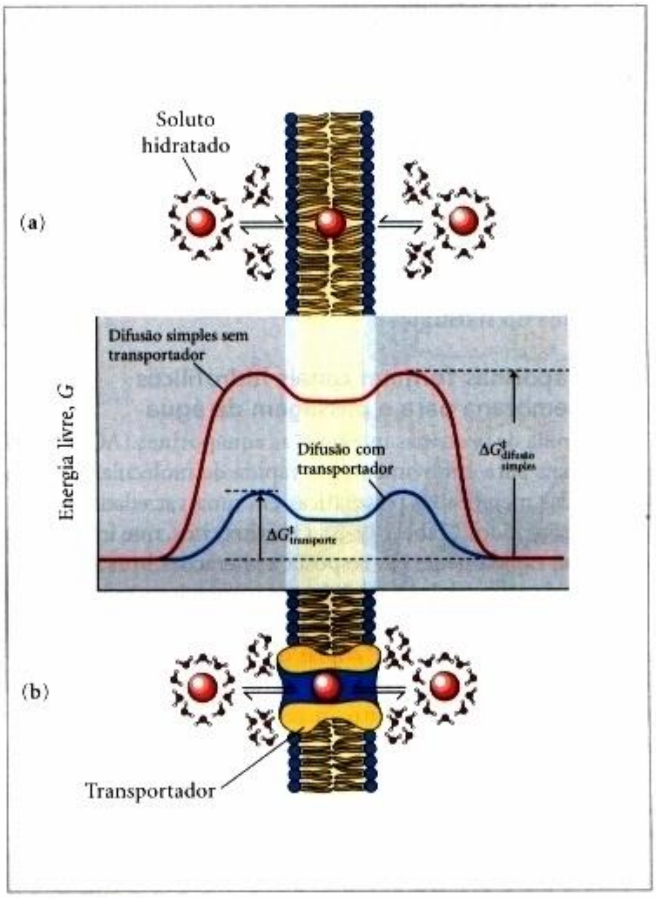

Soluto hidratado
(a)
Difusão simples sem transportador
Energia livre, G
Difusão com transportador
$\Delta G^{\ddagger}_{\text{difusão simples}}$
$\Delta G^{\ddagger}_{\text{transporte}}$
(b)
Transportador

Figura 12-23 – Variações de energia que acompanham a passagem de um soluto hidrofílico através da bicamada lipídica de uma membrana biológica. (**a**) Na difusão simples, a remoção da camada de hidratação é altamente endergônica e a energia de ativação ($\Delta G^{\ddagger}$) para a difusão através da bicamada é muito alta. (**b**) Uma proteína de transporte reduz o $\Delta G^{\ddagger}$ para a difusão transmembrana do soluto. Ela faz isso formando interações não-covalentes com o soluto desidratado para substituir suas pontes de hidrogênio com a água, fornecendo um caminho hidrofílico transmembrana.

para dentro e através do lipídio é recuperada quando o composto deixar a membrana do outro lado e for reidratado. Entretanto, a etapa intermediária da passagem transmembrana representa um estado de alta energia comparável ao estado de transição numa reação química catalisada por enzimas. Em ambos os casos, uma barreira de ativação deve ser ultrapassada para se atingir ao estado intermediário (Fig. 12-23, compare com a Fig. 8-3). A energia de ativação ($\Delta G^{\ddagger}$) para a translocação de um soluto polar através da bicamada é tão grande que bicamadas somente de lipídios são praticamente impermeáveis às espécies carregadas ou polares, considerando o período de tempo relevante para as células.

Alguns poucos gases biologicamente importantes podem atravessar membranas por difusão simples: oxigênio molecular, nitrogênio e metano, todos os quais são relativamente não-polares. Apesar da sua polaridade, a água atravessa algumas membranas biológicas lentamente por difusão simples, presumivelmente por causa da sua concentração muito alta (55M). Entretanto, para tecidos nos quais uma rápida movimentação da água transmembrana é essencial (nos rins, por exemplo), a água se difunde através de canais formados por proteínas integrais específicas, as aquaporinas, descritas a seguir.

A passagem transmembrana de compostos polares e íons torna-se possível por proteínas de membrana que diminuem a energia de ativação do transporte, fornecendo uma via alternativa para solutos específicos através da bicamada lipídica. As proteínas que proporcionam essa **difusão facilitada** ou **transporte passivo** não são enzimas no sentido usual; seus "substratos" movem-se de um compartimento para outro, mas não são alterados quimicamente. As proteínas de membrana que aumentam o movimento de um soluto através de uma membrana por difusão facilitada são chamadas de **transportadoras** ou **permeases**.

O tipo de informação estrutural detalhada obtido para muitas enzimas solúveis, por cristalografia de raios X, ainda não está disponível para a maioria dos transportadores de membrana; como um grupo, essas proteínas de membrana integrais são difíceis de purificar e cristalizar. Entretanto, a partir de estudos da especificidade e cinética dos transportadores, aprendemos que sua ação é muito análoga àquela das enzimas. Como as enzimas, os transportadores ligam-se a seus substratos com especificidade estereoquímica por meio de muitas interações fracas, não-covalentes. A variação de energia livre negativa que ocorre nessas ligações fracas, $\Delta G_{\text{ligação}}$, contrabalanceia a variação de energia livre positiva que acompanha a perda da água de hidratação do substrato, $\Delta G_{desidratação}$, diminuindo a energia de ativação, $\Delta G^{\ddagger}$, para a passagem transmembrana (Fig. 12-23). Os transportadores atravessam a bicamada lipídica pelo menos uma vez, usualmente várias vezes, formando um canal transmembrana revestido com as cadeias laterais de aminoácidos hidrofílicos. O canal fornece uma via alternativa para que esse substrato específico se mova através da bicamada lipídica, sem ter que se dissolver nela, diminuindo ainda mais o $\Delta G^{\ddagger}$ para a difusão transmembrana. O resultado é um aumento, de várias ordens de grandeza, na velocidade da passagem transmembrana do substrato.

As aquaporinas formam canais hidrofílicos transmembrana para a passagem de água

Uma família de proteínas integrais, as **aquaporinas** (AQPs), fornece canais para a movimentação rápida de moléculas de água através das membranas plasmáticas em uma variedade de tecidos especializados (Tabela 12-3). Os eritrócitos, que incham ou encolhem rapidamente em resposta a alterações bruscas na osmolaridade extracelular à medida que o sangue passa através do rim, possuem uma alta densidade de aquaporina nas suas membranas plasmáticas (2×10^5 cópias de AQP-1 por célula). Também ricas em aquaporina são as membranas plasmáticas das células dos túbulos renais proximais, que reabsorvem água durante a formação da urina, e a membrana vacuolar das células de plantas, que requerem um movimento osmótico da água para dentro do vacúolo a fim de manter a pressão de turgescência (veja Fig. 2-10). A Tabela 12-3 fornece alguns exemplos de aquaporinas.

Tabela 12-3 – Aquaporinas

Aquaporina	Papéis e localização
AQP-1	Reaborção de fluidos no túbulo renal proximal; secreção do humor aquoso no olho e do fluido cerebroespinhal no sistema nervoso central; a homeostase da água nos pulmões
AQP-2	Permeabilidade à água nos ductos coletores renais (mutações produzem o diabetes insípido nefrogênico)
AQP-3	Retenção de água nos ductos coletores renais
AQP-4	Reabsorção do fluido cerebroespinhal no sistema nervoso central; regulação do edema cerebral
AQP-5	Secreção de fluidos nas glândulas salivares, glândulas lacrimais e no epitélio alveolar do pulmão
γ-TIP	Captação de água pelo vacúolo de plantas, regulando a pressão de turgescência

Fonte: King LS & Agre P. (1996) Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Physiol* **58**, 619-648.

Todas as aquaporinas são proteínas integrais do tipo III (Fig. 12-14) com seis segmentos helicoidais transmembrana (Fig. 12-24a). Na AQP-1, quatro monômeros de M_r 28.000 formam um canal transmembrana tetraédrico revestido com cadeias laterais hidrofílicas, possuindo um diâmetro suficiente (~3Å) para permitir a passagem de moléculas de água em fila única (Fig. 12-24b). A água flui através de um canal de AQP-1 a uma velocidade de cerca de 5×10^8 moléculas por segundo. Para comparação, o maior número de renovação conhecido para uma enzima é aquele da catálase, $4 \times 10^7 s^{-1}$, e muitas enzimas possuem números de renovação entre $1s^{-1}$ e $10^4 s^{-1}$ (veja Tabela 8-7). A baixa energia de ativação para a passagem da água através dos canais de aquaporina ($\Delta G^{\ddagger} < 15$kJ/mol) sugere que a água se movimenta através do canal em uma corrente contínua, fluindo na direção ditada pelo gradiente osmótico. (Para uma discussão sobre a osmose, veja pág. 71). Da mesma forma que a maioria das aquaporinas, AQP-1 não permite a passagem de íons ou outros solutos pequenos.

O transportador da glicose dos eritrócitos medeia o transporte passivo

O metabolismo produtor de energia no eritrócito depende de um suprimento constante de glicose do plasma sangüíneo, no qual a concentração de glicose é mantida em cerca de 5mM. A glicose entra no eritrócito por difusão facilitada, por meio de um transportador específico da glicose, em uma velocidade cerca de 50.000 vezes maior que a velocidade de difusão não-catalisada. Esse transportador, bem estudado, fornece um exemplo excelente de como o transporte passivo é controlado na célula.

O transportador de glicose dos eritrócitos (chamado GluT1, para distingui-lo dos transportadores de glicose relacionados em outros tecidos) é uma proteína integral do tipo III (M_r 45.000) com 12 segmentos hidrofóbicos, cada um dos quais acredita-se que forme uma hélice que atravessa a membrana. A estrutura detalhada do GluT1 ainda não é conhecida, mas um modelo plausível sugere que a montagem lado a lado de várias hélices produza um canal transmembrana revestido com resíduos hidrofílicos que possam formar pontes de hidrogênio com a glicose à medida que ela se move através do canal (Fig. 12-25).

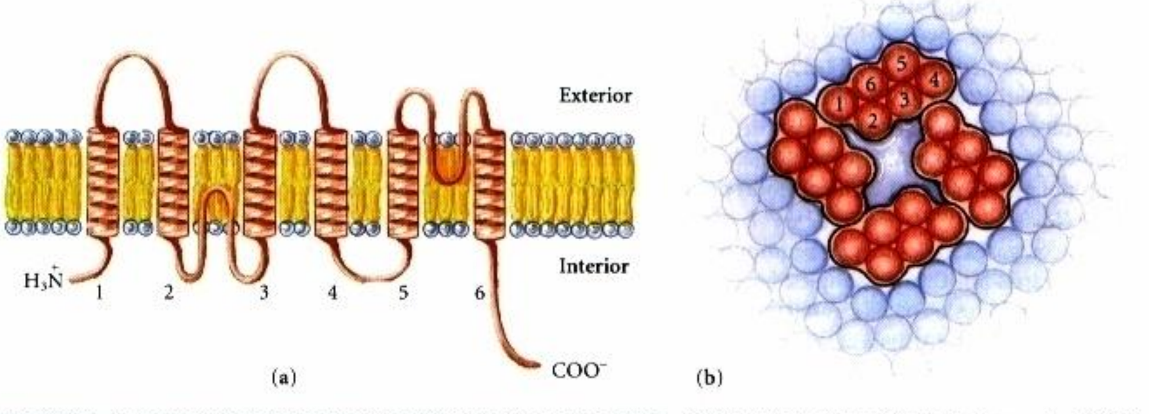


Figura 12-24 – Topologia transmembrana provável de uma aquaporina, AQP-1. Esta proteína é também chamada de CHIP-28. (**a**) Cada monômero consiste de seis hélices transmembrana. (**b**) Em uma estrutura proposta para o canal da aquaporina (visto perpendicularmente ou através do plano da membrana), quatro monômeros da AQP-1 se associam, lado a lado, com suas 24 hélices transmembrana cercando um canal central (sombreado azul). O canal, através do qual as moléculas de água se difundem uma a uma, é coberto com cadeias laterais hidrofílicas.

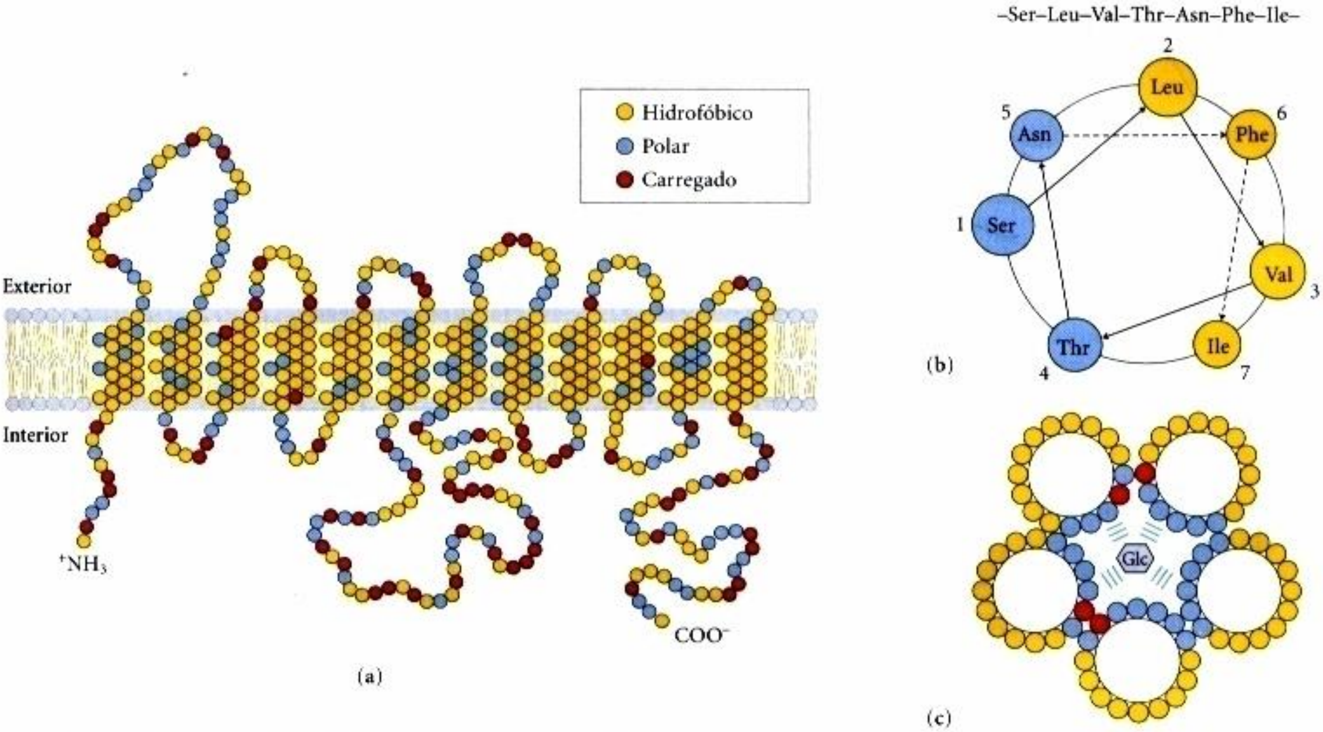


Figura 12-25 – Estrutura proposta para o GluT1. (**a**) Hélices transmembrana são representadas como filas oblíquas de três ou quatro resíduos de aminoácidos, cada fila descrevendo uma volta da α-hélice. Nove das 12 hélices contêm três ou mais resíduos de aminoácidos carregados ou polares, freqüentemente separados por vários resíduos hidrofóbicos. (**b**) Um diagrama helicoidal circular mostra a distribuição dos resíduos polares e não-polares na superfície de um segmento helicoidal. A hélice é esquematizada como se fosse observada ao longo de seu eixo maior a partir do aminoterminal. Resíduos adjacentes na seqüência linear são conectados com setas, e cada resíduo é colocado em volta do círculo na posição que ele ocupa na hélice; lembre-se de que 3,6 resíduos são requeridos para realizar uma volta completa da α-hélice. Neste exemplo, os resíduos polares (em azul) estão de um lado da hélice e os resíduos hidrofóbicos (em amarelo) do outro lado. Isso é, por definição, uma hélice anfipática. (**c**) A associação lado a lado de cinco ou seis hélices anfipáticas, cada uma com sua face polar orientada para a cavidade central, pode produzir um canal transmembrana revestido com resíduos polares e carregados. Esse canal fornece muitas oportunidades para a formação de pontes de hidrogênio com a glicose, movimentando-se ao longo do transportador. A estrutura tridimensional do GluT1 não foi ainda determinada por cristalografia de raios X, mas os pesquisadores esperam que os canais transmembrana hidrofílicos deste e de muitos outros transportadores e os canais iônicos provarão assemelhar-se com este modelo.

O processo de transporte da glicose pode ser descrito pela analogia com uma catálise enzimática em que o "substrato" é a glicose fora da célula (S_{fora}), o "produto" é a glicose dentro da célula (S_{dentro}) e a "enzima" é o transportador, T. Quando a velocidade de captação da glicose é medida em função da concentração da glicose externa (Fig. 12-26), a representação resultante é hiperbólica; em concentrações altas de glicose externa, a velocidade de captação se aproxima à $V_{máx}$. Formalmente, esse processo de transporte pode ser descrito pelas equações

$$S_{fora} + T \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} S_{fora}\cdot T \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} S_{dentro}\cdot T \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} S_{dentro} + T$$

onde k_1, k_{-1} etc., são as constantes da velocidade para cada etapa, em uma direção e em sua reversa. As etapas são resumidas na Figura 12-27.

As equações da velocidade para esse processo podem ser derivadas exatamente como aquelas das reações catalisadas por enzimas (Capítulo 8), produzindo uma expressão análoga à equação de Michaelis-Menten (pág. 200):

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]_{fora}}{K_t + [S]_{fora}}$$

onde V_0 é a velocidade inicial do acúmulo de glicose dentro da célula, quando sua concentração no meio circundante é $[S]_{fora}$, e K_t ($K_{transporte}$) é uma constante análoga à constante de Michaelis-Menten, uma combinação das constantes de velocidade características para cada sistema de transporte. Esta equação descreve a velocidade *inicial* — a velocidade observada quando $[S]_{dentro} = 0$. Como no caso para as reações catalisadas por enzimas, a forma

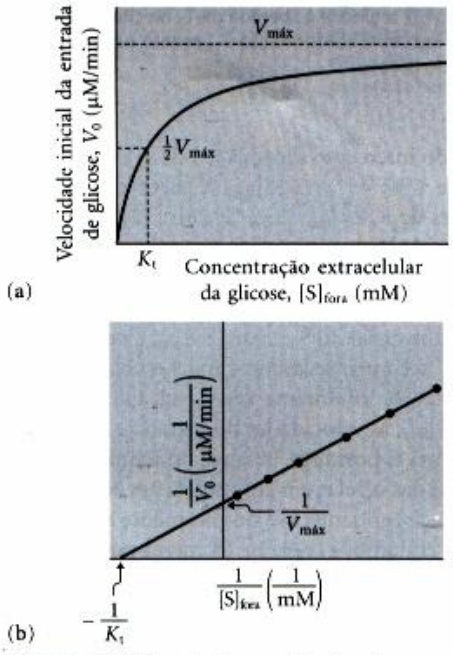


Figura 12-26 – Cinética do transporte de glicose para dentro dos eritrócitos. (**a**) A velocidade inicial da entrada de glicose em um eritrócito, V_0, depende da concentração inicial da glicose no lado externo, $[S]_{fora}$. (**b**) Representação duplo-recíproca dos dados em (**a**). As cinéticas da difusão facilitada são análogas às cinéticas de uma reação catalisada por enzimas. Compare estes gráficos com os da Figura 8-11 e Figura 1 no Adendo 8-1. Observe que K_t é análogo a K_m, a constante de Michaelis-Menten.

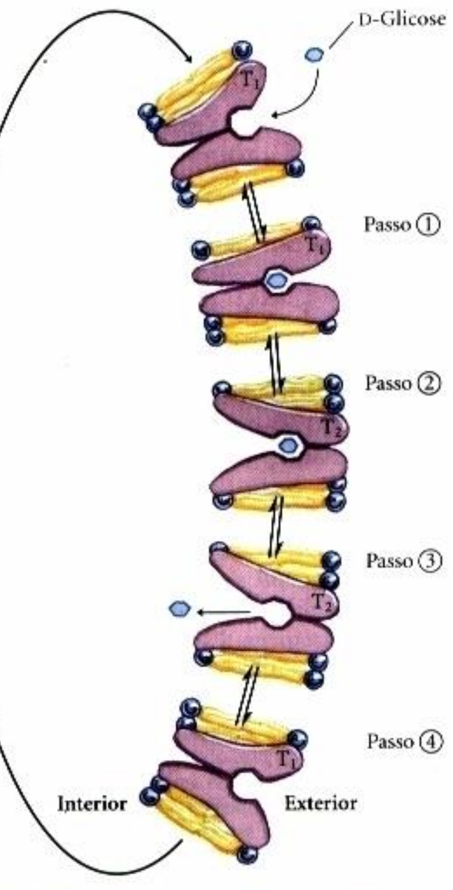

D-Glicose
T_1
Passo ①
T_1
Passo ②
T_2
Passo ③
T_2
Passo ④
T_1
Interior
Exterior

Figura 12-27 – Modelo de transporte da glicose pelo GluT1 nos eritrócitos. O transportador existe em duas conformações. T_1, com o sítio de ligação da glicose exposto na superfície externa da membrana plasmática, e T_2, com o sítio de ligação na superfície interna. O transporte de glicose ocorre em quatro passos. No passo ①, a glicose no plasma sangüíneo liga-se a um sítio estereoespecífico em T_1, diminuindo dessa forma a energia de ativação para uma alteração conformacional (passo ②) de $S_{fora} \cdot T_1$ para $S_{dentro} \cdot T_2$, efetuando a passagem transmembrana da glicose. No passo ③, a glicose é liberada de T_2 no citosol e, no passo ④, o transportador retorna à conformação T_1, pronto para transportar uma outra molécula de glicose.

da inclinação do intercepto da equação descreve uma representação linear de $1/V_0$ *versus* $1/[S]_{fora}$, a partir da qual podemos obter os valores de K_t e $V_{máx}$ (Fig. 12-26b). K_t, como K_m, é uma medida da afinidade do transportador pelo substrato: quanto menor o K_t, maior a afinidade.

Pelo fato de as ligações químicas não serem sintetizadas nem quebradas na conversão do S_{fora} para o S_{dentro}, nem o "substrato" ou o "produto" ser intrinsecamente mais estável, o processo de entrada é, portanto, totalmente reversível. Quando $[S]_{dentro}$ se aproxima de $[S]_{fora}$, as velocidades de entrada e saída tornam-se iguais. Tal sistema é, portanto, incapaz de acumular o substrato (glicose) dentro das células em concentrações acima das encontradas no meio circundante; ele simplesmente alcança o equilíbrio da glicose em ambos os lados da membrana a uma velocidade muito maior que aquela que ocorreria na ausência de um transportador específico. GluT1 é específico para a D-glicose, possuindo um K_t medido de 1,5mM. Para os análogos próximos, a D-manose e a D-galactose, que diferem apenas na posição de um grupo hidroxila, os valores de K_t são de 20 e 30mM, respectivamente; e, para a L-glicose, o K_t excede a 3.000mM! Dessa forma, GluT1 apresenta as três características autênticas do transporte passivo: altas velocidades de difusão no sentido do gradiente de concentração, saturabilidade e especificidade. Pelo fato de a concentração da glicose no sangue, 4,5 a 5mM, ser mantida em cerca de três vezes o K_t, o GluT1 está aproximadamente saturado com o substrato e opera próximo à $V_{máx}$.

No fígado, um transportador de glicose diferente, o GluT2, transporta glicose para fora dos hepatócitos quando o glicogênio hepático é quebrado para substituir a glicose sangüínea. GluT2 possui um K_t de cerca de 66mM e pode, portanto, responder a níveis aumentados de glicose intracelular aumentando o transporte para fora. Os tecidos muscular e adiposo possuem ainda um outro transportador de glicose, o GluT4, que se distingue por sua estimulação pela insulina (Adendo 12-2).

O cloreto e o bicarbonato são co-transportados através da membrana do eritrócito

O eritrócito contém um outro sistema de difusão facilitada, um trocador de ânion, que é essencial no transporte do CO_2 para os pulmões, a partir de tecidos, como o músculo e o fígado. O CO_2 residual liberado durante a respiração dos tecidos para o plasma sangüíneo entra no eritrócito, onde é convertido em bicarbonato (HCO_3^-) pela enzima anidrase carbônica. O HCO_3^- retorna ao plasma sangüíneo para ser transportado até os pulmões (Fig. 12-28). Pelo fato de o HCO_3^- ser muito mais solúvel no plasma sangüíneo que o CO_2, essa via sinuosa aumenta a capacidade do sangue de transportar o dióxido de carbono dos tecidos até os pulmões. Nos pulmões, o HCO_3^- retorna ao eritrócito e é convertido em CO_2, que é eventualmente liberado no espaço pulmonar e exalado. Para que esse caminho de mão dupla seja efetivo é exigida uma movimentação muito rápida do HCO_3^- através da membrana do eritrócito.

O **trocador cloreto-bicarbonato**, também chamado de **proteína trocadora de ânion**, aumenta a permeabilidade da membrana do eritrócito ao HCO_3^- mais de um milhão de vezes. Da mesma forma que o transportador da glicose, ele é uma proteína integral que provavelmente atravessa a membrana 12 vezes. Essa proteína medeia a movimentação de dois ânions: para cada íon HCO_3^- que se move em uma direção, um íon Cl^- deve mover-se na direção oposta (Fig. 12-28). O acoplamento da movimentação Cl^- e HCO_3^- é obrigatório; na ausência de cloreto, o transporte de bicarbonato é interrompido. A esse respeito, o

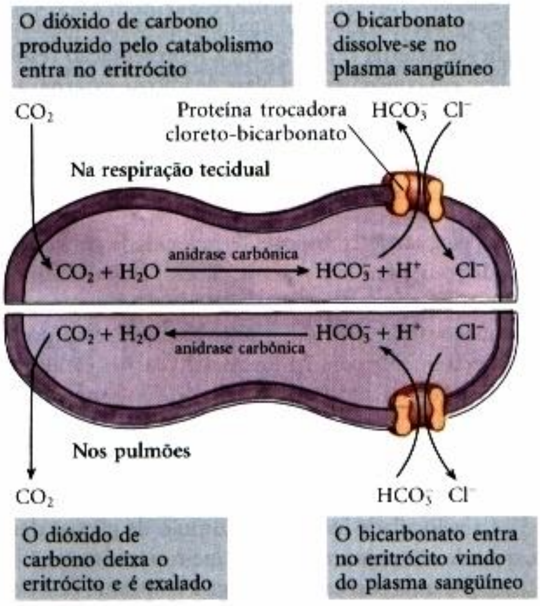

O dióxido de carbono produzido pelo catabolismo entra no eritrócito
O bicarbonato dissolve-se no plasma sangüíneo
CO_2
Proteína trocadora cloreto-bicarbonato
HCO_3^- Cl^-
Na respiração tecidual
$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{anidrase carbônica}} HCO_3^- + H^+$
Cl^-
$CO_2 + H_2O \xleftarrow[\text{anidrase carbônica}]{} HCO_3^- + H^+$
Cl^-
Nos pulmões
CO_2
HCO_3^- Cl^-
O dióxido de carbono deixa o eritrócito e é exalado
O bicarbonato entra no eritrócito vindo do plasma sangüíneo

Figura 12-28 – O trocador cloreto-bicarbonato da membrana eritrocitária. Este sistema de transporte duplo permite a entrada e a saída de HCO_3^- sem alteração no potencial elétrico transmembrana. O seu papel é aumentar a capacidade de transporte de CO_2 sangüíneo.

Adendo 12-2 Transporte defeituoso da glicose e da água em duas formas de diabetes

Quando a ingestão de uma refeição rica em carboidratos leva a glicose sangüínea a exceder a concentração usual entre as refeições (5mM), o excesso de glicose é captado pelos músculos cardíacos e esqueléticos (que o armazenam como glicogênio) e pelos adipócitos (que o convertem em triacilgliceróis). A captação de glicose nos miócitos e adipócitos é mediada pelo transportador de glicose GluT4. Entre as refeições, a membrana plasmática dessas células contém algum GluT4, mas a maioria está seqüestrada nas membranas de pequenas vesículas intracelulares (Fig. 1). A liberação de insulina do pâncreas, em resposta à alta glicose sangüínea, desencadeia a movimentação dessas vesículas intracelulares para a membrana plasmática, na qual elas se fundem, expondo, portanto, as moléculas de GluT4 na superfície externa da célula. Com mais moléculas de GluT4 em ação, a velocidade da captação da glicose aumenta 15 vezes ou mais. Quando os níveis de glicose sangüínea retornam ao normal, a liberação de insulina diminui e a maioria das moléculas de GluT4 é removida a partir da membrana plasmática e armazenada em vesículas.

No diabetes melito tipo I (de incidência juvenil), a inabilidade de liberar insulina (e, portanto, de mobilizar os transportadores de glicose) resulta em baixas velocidades de captação de glicose nos tecidos muscular e adiposo. Uma conseqüência é um período prolongado de alta glicose sangüínea depois de uma refeição rica em carboidratos. Essa condição é a base do teste de tolerância à glicose usado para diagnosticar o diabetes (Capítulo 23).

A permeabilidade à água das células epiteliais que revestem os ductos coletores renais no rim é devida à presença de uma aquaporina (AQP-2) nas membranas plasmáticais apicais (que estão voltadas para a luz do ducto). O hormônio antidiurético (ADH) regula a retenção de água mobilizando as moléculas de AQP-2 armazenadas nas membranas das vesículas dentro das células epiteliais, da mesma forma que a insulina mobiliza GluT4 nos tecidos muscular e adiposo. Quando as vesículas se fundem com a membrana plasmática da célula epitelial, a permeabilidade à água aumenta dramaticamente e mais água é reabsorvida a partir do ducto coletor e retorna ao sangue. Quando o nível de ADH cai, a AQP-2 é resseqüestrada dentro das vesículas, reduzindo a retenção de água. No diabetes insípido, doença humana relativamente rara, um defeito genético na AQP-2 leva a um prejuízo na reabsorção de água pelo rim. O resultado é a excreção de volumes copiosos de urina muito diluída.

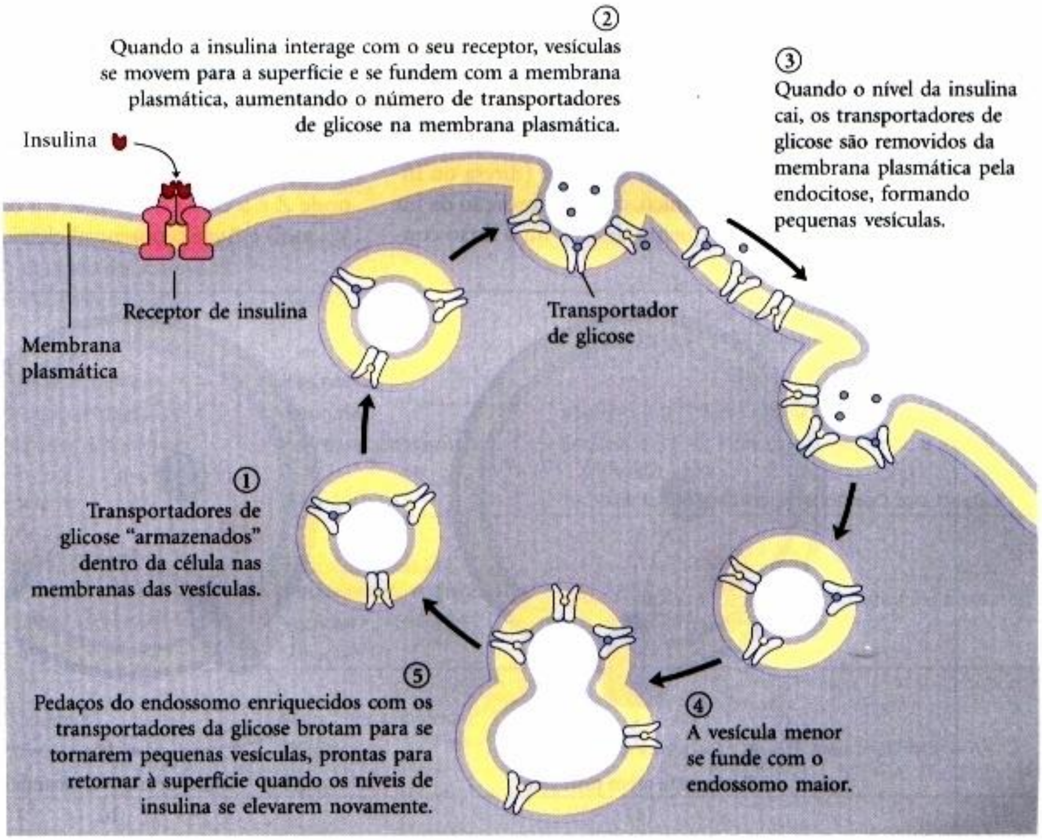

②
Quando a insulina interage com o seu receptor, vesículas se movem para a superfície e se fundem com a membrana plasmática, aumentando o número de transportadores de glicose na membrana plasmática.
③
Quando o nível da insulina cai, os transportadores de glicose são removidos da membrana plasmática pela endocitose, formando pequenas vesículas.
Insulina
Receptor de insulina
Membrana plasmática
Transportador de glicose
①
Transportadores de glicose "armazenados" dentro da célula nas membranas das vesículas.
⑤
Pedaços do endossomo enriquecidos com os transportadores da glicose brotam para se tornarem pequenas vesículas, prontas para retornar à superfície quando os níveis de insulina se elevarem novamente.
④
A vesícula menor se funde com o endossomo maior.

Figura 1 – Regulação pela insulina do transporte de glicose dentro de um miócito.

trocador de ânions é típico para todos os sistemas, chamados **sistemas de transporte duplo**, que carregam simultaneamente dois solutos através de uma membrana. Quando, como nesse caso, os dois substratos movem-se em direções opostas, o processo é o contratransporte. No **co-transporte**, os dois substratos movem-se simultaneamente na mesma direção. Os transportadores que carregam apenas um substrato, como o transportador da glicose, são algumas vezes chamados de sistemas de **transporte único** (Fig. 12-29).

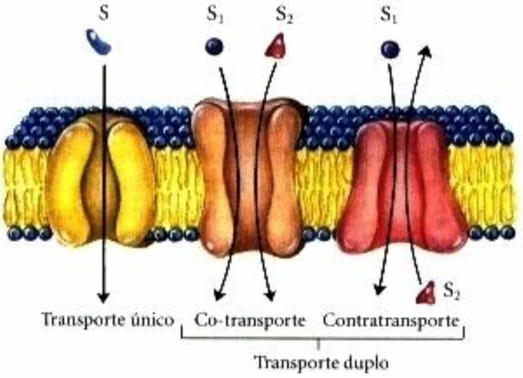


Figura 12-29 – Três classes gerais de sistemas de transporte. Os transportadores diferem no número de solutos (substratos) transportados e na direção em que cada um é transportado. Exemplos de todos os três tipos de transportadores são apresentados no texto. Observe que esta classificação não diz nada se esses processos são requerentes de energia (transporte ativo) ou independentes de energia (transporte passivo).

O transporte ativo leva à movimentação do soluto contra um gradiente de concentração ou eletroquímico

No transporte passivo, as espécies transportadas sempre se movem na direção do gradiente eletroquímico e não ocorre nenhum acúmulo acima do ponto de equilíbrio. O transporte ativo, pelo contrário, leva ao acúmulo de um soluto acima do ponto de equilíbrio. O transporte ativo é termodinamicamente desfavorável (endergônico) e ocorre apenas quando acoplado (direta ou indiretamente) a um processo exergônico, como a absorção da luz solar, uma reação de oxidação, a quebra de ATP ou o fluxo concomitante de alguma outra espécie química na direção de seu gradiente eletroquímico. No **transporte ativo primário**, a acumulação do soluto é acoplada diretamente a uma reação química exergônica, como a conversão de ATP em ADP + P_i (Fig. 12-30). O **transporte ativo secundário** ocorre quando o transporte endergônico de um soluto (na direção ascendente) é acoplado ao fluxo exergônico de um soluto diferente (na direção descendente) que foi originalmente bombeado na direção ascendente por um transporte ativo primário.

A quantidade de energia necessária para o transporte de um soluto contra um gradiente pode ser facilmente calculada a partir do gradiente de concentração inicial. A equação geral para a variação da energia livre no processo químico que converte S em P é

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln [\mathrm{P}]/[\mathrm{S}] \qquad (12\text{-}1)$$

onde R é a constante dos gases 8,315J/mol · K, e T a temperatura absoluta. Quando a "reação" é simplesmente o transporte de um soluto de uma região em que sua concentração é C_1 a uma outra região em que sua concentração é C_2, nenhuma ligação química é formada ou quebrada e a variação da energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$, é igual a zero. A variação de energia livre para o transporte, ΔG_t, é então

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) \qquad (12\text{-}2)$$

Se houver uma diferença na concentração entre os dois compartimentos, de cerca de 10 vezes, o custo de se movimentar 1 mol de um soluto não-carregado a 25°C através de uma membrana separando dois compartimentos é, portanto,

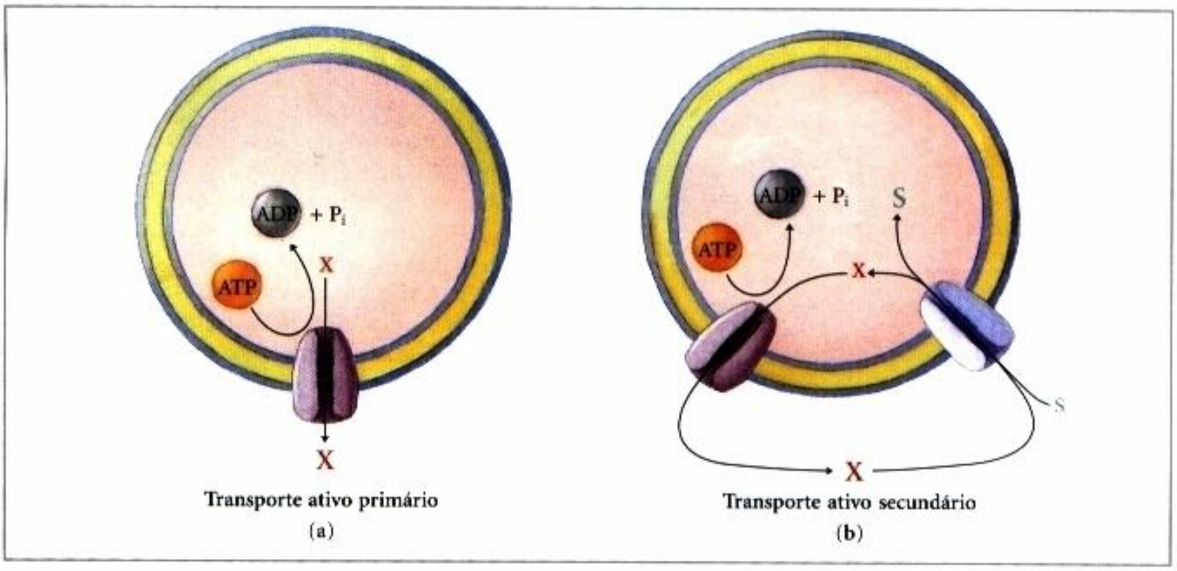
$$\Delta G_t = (8{,}315\text{J/mol} \cdot \text{K})(298\text{K})(\ln 10/1) = 5.705\text{J/mol} = 5{,}7\text{kJ/mol}$$

A Equação 12-2 vale para todos os solutos não-carregados.

Quando o soluto for um íon, a sua movimentação sem o acompanhamento de um contra-íon leva à separação endergônica de cargas positivas e negativas, produzindo um potencial elétrico; tal processo de transporte é dito **eletrogênico**. O custo energético de se movimentar um íon depende do potencial eletroquímico (pág. 316), a soma dos gradientes químico e elétrico:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + Z \mathcal{F} \Delta\psi \qquad (12\text{-}3)$$

onde Z é a carga do íon, $\mathcal{F}$ é a constante de Faraday (96.480J/V · mol) e $\Delta\psi$ é o potencial elétrico transmembrana (em volts).



Transporte ativo primário
(a)

Transporte ativo secundário
(b)

Figura 12-30 – Dois tipos de transporte ativo. (**a**) No transporte ativo primário, a energia liberada pela hidrólise de ATP direciona o movimento do soluto contra um gradiente eletroquímico. (**b**) No transporte ativo secundário, um gradiente de um íon X (freqüentemente o Na^+) foi estabelecido por um transporte ativo primário. O movimento do íon X a favor de seu gradiente eletroquímico fornece, então, a energia para direcionar o co-transporte de um segundo soluto (S) contra seu gradiente eletroquímico.

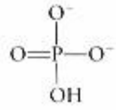
Células eucarióticas típicas possuem potenciais elétricos ao longo de suas membranas plasmáticas da ordem de 0,05 a 0,2V (com o interior negativo relativo ao exterior), de tal forma que o segundo termo da Equação 12-3 pode ser uma contribuição significante para a variação da energia livre total do transporte de um íon. A maioria das células mantém diferenças de mais de 10 vezes nas concentrações de íons através de suas membranas plasmáticas ou intracelulares, e, para muitas células e tecidos, o transporte ativo é, portanto, um dos principais processos consumidores de energia.

O mecanismo do transporte ativo é de importância fundamental na biologia. Como veremos no Capítulo 19, a formação do ATP nas mitocôndrias e nos cloroplastos ocorre por um mecanismo que é essencialmente um transporte de íon direcionado por ATP, operando no sentido reverso. A energia tornada disponível pelo fluxo espontâneo de prótons através da membrana é calculada pela Equação 12-3; lembre-se de que, para o fluxo na *direção* de um gradiente eletroquímico, o sinal ΔG é oposto ao do transporte *contra* o gradiente.

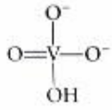
Há pelo menos quatro tipos gerais de ATPases de transporte

No curso da evolução, vários tipos distintos de transportes ativos dependentes de ATP surgiram, diferindo na estrutura, no mecanismo e na localização em tecidos e compartimentos intracelulares específicos (Tabela 12-4).

ATPases do tipo P são transportadores de cátion direcionados por ATP, que são reversivelmente fosforilados por ATP como parte do ciclo de transporte. Todas ATPases de transporte do tipo P possuem semelhanças na seqüência de aminoácidos, especialmente ao redor do resíduo da Asp que sofre fosforilação, e todas são sensíveis à inibição pelo análogo do fosfato, o **vanadato**.



Fosfato



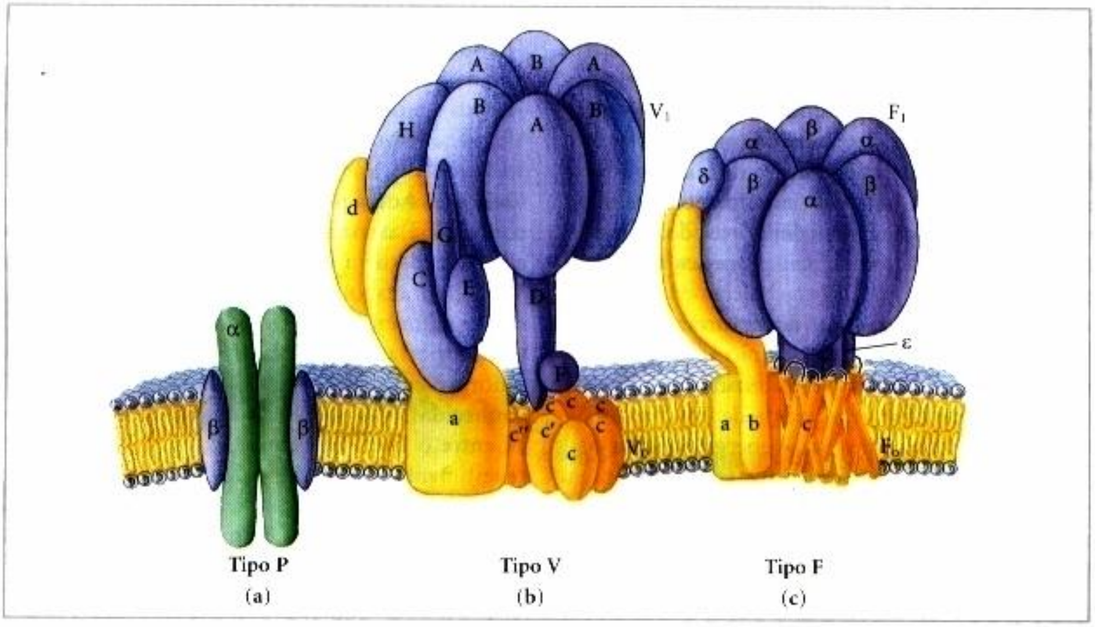
Vanadato

Cada uma é uma proteína integral de membrana com múltiplas regiões que atravessam a membrana num único polipeptídeo; algumas possuem também uma segunda subunidade (Fig. 12-31a). Os transportadores do tipo P são largamente distribuídos na natureza. Nos tecidos animais, a ATPase Na^+K^+, um contratransportador para Na^+ e K^+, e a Ca^{2+} ATPase, um transportador único para Ca^{2+}, são ubíquas, ATPases do tipo P bem conhecidas, que mantêm o desequilíbrio na composição iônica entre o citosol e o meio extracelular. Células parietais no revestimento do estômago de mamíferos possuem uma ATPase do tipo P que bombeia H^+ e K^+ através da membrana plasmática acidificando, dessa forma, o conteúdo do estômago. Nas plantas superiores, uma ATPase do tipo P bombeia prótons para fora da célula, estabelecendo uma diferença de duas unidades de pH e 250mV através da membrana plasmática. Uma ATPase do tipo P semelhante, no mofo do pão *Neurospora*, bombeia prótons para fora das células, para estabelecer um potencial de membrana negativo dentro da célula, o qual é usado para direcionar a captação de substratos e íons do meio circundante por transportadores ativos secundários. Bactérias usam as ATPases do tipo P para bombear para fora íons metálicos pesados tóxicos, como Cd^{2+} e Cu^{2+}.

Uma classe diferente de ATPases de transporte de prótons é responsável pela acidificação dos compartimentos intracelulares em muitos organismos. Os vacúolos das plantas superiores e dos fungos mantêm um pH entre 3 e 6, bem abaixo do do cito-

Tabela 12-4 – Quatro classes de ATPases de transporte

	Organismo ou tecido	Tipo de membrana	Papel da ATPase
ATPases do tipo P			
Na^+K^+	Tecidos animais	Plasmática	Mantém $[Na^+]$ baixa, $[K^+]$ alta dentro da célula; cria potencial elétrico transmembrana
H^+K^+	Células secretoras (parietais) de ácido dos mamíferos	Plasmática	Acidifica o conteúdo do estômago
H^+	Fungos (*Neurospora*)	Plasmática	Cria gradiente de H^+ para direcionar o transporte secundário de solutos extracelulares para dentro da célula
H^+	Plantas superiores	Plasmática	
Ca^{2+}	Tecidos animais	Plasmática	Mantém $[Ca^{2+}]$ baixa no citosol
Ca^{2+}	Miócitos dos animais	Retículo endoplasmático	Seqüestra o Ca^{2+} intracelular, mantendo a $[Ca^{2+}]$ citosólica baixa
Cd^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}	Bactérias	Plasmática	Bombeia íons metálicos pesados para fora da célula
ATPases do tipo V			
H^+	Animais	Vesículas secretoras, lisossômicas, endossômicas	Cria pH baixo no compartimento, ativando proteases e outras enzimas hidrolíticas
H^+	Plantas superiores	Vacuolar	
H^+	Fungos	Vacuolar	
ATPases do tipo F			
H^+	Eucariotos	Mitocondrial interna	Catalisa a formação de ATP a partir de ADP + P_i
H^+	Plantas superiores	Tilacóide	
H^+	Procariotos	Plasmática	
Transportador multidrogas			
	Célula tumoral de animais	Plasmática	Remove uma grande variedade de produtos naturais hidrofóbicos e de drogas sintetizadas do citosol, incluindo vimblastina, doxorrubicina, actinomicina D, mitomicina, taxol, colchicina e puromicina



Tipo P
(a)

Tipo V
(b)

Tipo F
(c)

Figura 12-31 – Estrutura das subunidades dos três tipos de ATPases transportadoras de íons. (**a**) As ATPases do tipo P possuem dois tipos de subunidades da proteína integral. A subunidade α, que é essencial, possui um resíduo Asp que é fosforilado durante o transporte. (**b**) As ATPases do tipo V possuem um domínio periférico, V_1 (azul), composto de sete tipos diferentes de subunidades, incluindo três A e três B, e um domínio integral, V_0 (amarelo), com três tipos de subunidades, incluindo cópias múltiplas de c. (**c**) ATPases do tipo F possuem um domínio periférico, F_1 (azul), homólogo com V_1 das ATPases do tipo V. A porção integral das ATPases dos tipos F, F_0 (amarelo), também possui três tipos de subunidades, com cópias múltiplas de c. Bombas do tipo P, como as ATPases Na^+K^+, movem os dois íons em direção oposta. As bombas de prótons dos tipos V e F movem prótons em uma direção — do topo ao fundo neste diagrama — para *dentro* dos vacúolos para o tipo V e para *fora* das mitocôndrias para o tipo F.

sol circundante (pH 7,5), pela ação das bombas de próton — **ATPases do tipo V**. As ATPases do tipo V (de vacúolo) são também responsáveis pela acidificação nos lisossomos, nos endossomos, no complexo de Golgi e nas vesículas secretoras nas células animais. Estruturalmente não relacionadas às ATPases do tipo P, as ATPases do tipo V não sofrem fosforilação e desfosforilação cíclicas e não são inibidas pelo vanadato. Todas as ATPases do tipo V possuem uma estrutura complexa semelhante, com um domínio integral (transmembrana) (V_0), que funciona como um canal de próton, e um domínio periférico (V_1), que contém o sítio de ligação do ATP e a atividade ATPase (Fig. 12-31b). O mecanismo pelo qual as ATPases do tipo V acoplam a hidrólise do ATP ao transporte ascendente de prótons não é conhecido em detalhe. As bombas de prótons do tipo V são relacionadas em estrutura, e provavelmente em mecanismo, a uma terceira família de bombas de prótons, as ATPases do tipo F.

As **ATPases do tipo F** desempenham um papel central nas reações conservadoras de energia nas bactérias, nas mitocôndrias e nos cloroplastos; esse papel será discutido em detalhe quando descrevermos a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação no Capítulo 19. (O *F* de seu nome origina-se de sua identificação como *f*atores de acoplamento de energia.) Elas catalisam a passagem ascendente de prótons transmembrana, direcionada pela hidrólise do ATP, bem como a reação reversa, na qual o fluxo descendente de prótons direciona a síntese do ATP (Fig. 12-32). No segundo caso, as ATPases do tipo F são mais apropriadamente chamadas de **ATP sintases**. O gradiente de prótons na fosforilação oxidativa e na fotofosforilação é estabelecido por outros tipos de bombas de prótons carregadas pela oxidação do substrato ou pela luz solar. As ATPases do tipo F/ATP sintases são complexos multissubunidades que fornecem um poro transmembrana (a proteína integral F_0) para prótons e uma máquina molecular (a proteína periférica F_1) que usa a energia liberada pelo fluxo de próton descendente por meio de F_0 para formar as ligações fosfoanidro do ATP. As atividades ATP sintetizadora e a ATPase residem na proteína F_1 (Fig. 12-31c).

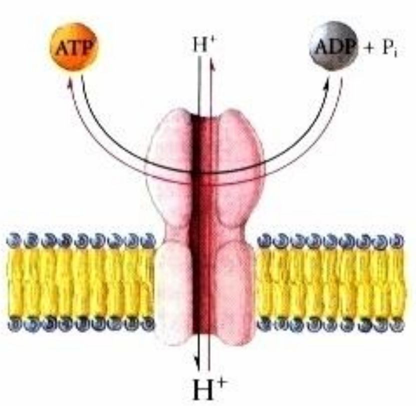


Figura 12-32 – Reversibilidade das ATPases do tipo F. Um transportador de prótons direcionado por ATP também catalisa a síntese de ATP à medida que os prótons fluem na direção de seu gradiente eletroquímico.

Na metade da década de 1980, tornou-se aparente que alguns tumores poderiam ser marcadamente resistentes a vários compostos antitumores, geralmente efetivos. A investigação revelou que as membranas plasmáticas desses tumores contêm um transportador dependente de ATP que pode exportar muitas drogas diferentes, prevenindo seu acúmulo dentro das células tumorais e seus efeitos inibitórios sobre o crescimento. Os transportadores de drogas são quimicamente não-semelhantes, mas geralmente hidrofóbicos. O **transportador multidrogas** responsável pela remoção dessas drogas do citosol da célula tumoral é uma proteína integral (M_r 170.000) com 12 segmentos transmembrana e dois sítios de ligação do ATP. A exportação de drogas é direcionada pela hidrólise do ATP. O transportador multidrogas é também um canal iônico que especificamente permite a difusão transmembrana do Cl^- a favor de seu gradiente de concentração; essa atividade é independente do ATP. Na fibrose cística, doença genética, o defeito subjacente está no gene que codifica uma proteína transportadora de Cl^-, o regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR, do inglês, "*cystic fibrosis transmembrane regulator*"), que pode ser relacionado ao transportador multidrogas das células tumorais (Adendo 12-3).

Uma ATPase do tipo P catalisa o transporte ativo duplo de Na^+ e K^+

Em praticamente toda célula animal, a concentração de Na^+ é menor na célula que no meio circundante, e a concentração de K^+ é maior (Fig. 12-33). Esse desequilíbrio é estabelecido e mantido por um sistema de transporte ativo primário na membrana plasmática. A enzima **ATPase Na^+K^+**, descoberta por Jens Skou em 1957, acopla a quebra de ATP à movimentação simultânea de Na^+ e K^+, contra seus gradientes eletroquímicos. Para cada molécula de ATP convertida em ADP e P_i, o transportador move dois íons K^+ para dentro e três íons Na^+ para fora, através da membrana plasmática. A ATPase Na^+K^+ é uma proteína integral com duas subunidades (M_r ~50.000 e M_r ~110.000) que atravessam a membrana.

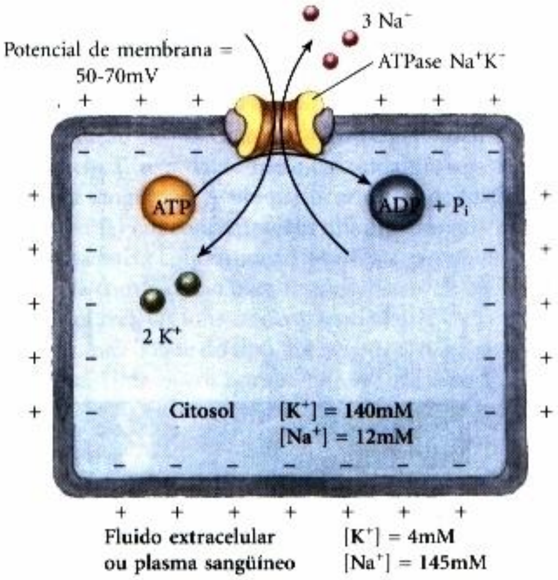
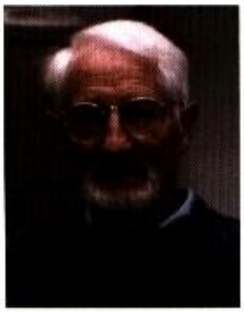


Figura 12-33 – A ATPase Na^+K^+. Nas células animais, este sistema de transporte ativo é responsável principalmente pela criação e manutenção das concentrações intracelulares de Na^+ e K^+ e pela geração do potencial elétrico transmembrana. Ele faz isso pela movimentação de 3 Na^+ para fora da célula para cada 2 K^+ que entram. O potencial elétrico é central para a sinalização elétrica nos neurônios, e o gradiente de Na^+ é usado para impulsionar vários solutos contra o gradiente em uma variedade de tipos celulares.



Jens Skou

O mecanismo minucioso, pelo qual a hidrólise do ATP é acoplada ao transporte, aguarda determinação da estrutura protéica tridimensional; entretanto, o atual modelo de trabalho (Fig. 12-34) supõe que a ATPase oscile entre duas formas: a forma fosforilada (designada P-Enz_{II}), com alta afinidade para K^+ e baixa afinidade para Na^+, e a forma desfosforilada (Enz_I), com alta afinidade para Na^+ e baixa afinidade para K^+. A conversão de ATP em ADP e P_i ocorre em duas etapas catalisadas pela enzima.

(1) Formação da fosfoenzima:

$$\text{ATP} + \text{Enz}_I \longrightarrow \text{ADP} + \text{P-Enz}_{II}$$

(2) Hidrólise da fosfoenzima:

$$\text{P-Enz}_{II} + H_2O \longrightarrow \text{Enz}_I + P_i$$

A reação final para estas duas etapas é

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i$$

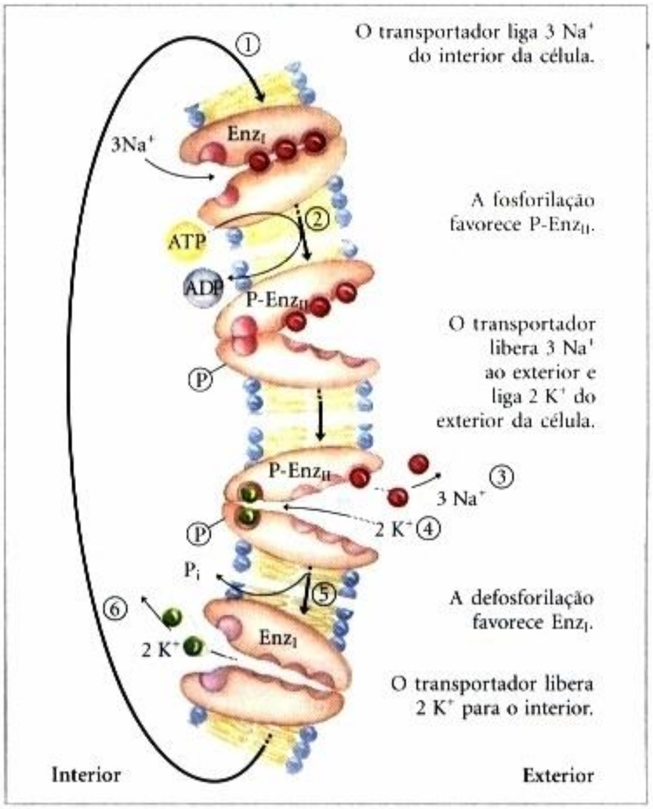

①
O transportador liga 3 Na⁺ do interior da célula.
3Na⁺
Enzᵢ
②
A fosforilação favorece P-Enzᵢᵢ.
ATP
ADP
P-Enzᵢᵢ
P
O transportador libera 3 Na⁺ ao exterior e liga 2 K⁺ do exterior da célula.
P-Enzᵢᵢ
③
3 Na⁺
2 K⁺④
P
Pᵢ
⑤
A defosforilação favorece Enzᵢ.
⑥
2 K⁺
Enzᵢ
O transportador libera 2 K⁺ para o interior.
Interior
Exterior

Figura 12-34 – Mecanismo postulado para o transporte de Na^+ e K^+ pela ATPase Na^+K^+. ① O processo inicia-se com a ligação de três Na^+ a sítios de alta afinidade na subunidade maior da proteína transportadora, na superfície interna (citosólica) da membrana. Essa mesma parte da subunidade maior também possui o sítio de ligação do ATP. A fosforilação do transportador altera sua conformação ② e diminui sua afinidade por Na^-, levando à ③ liberação do Na^+ na superfície externa (extracelular). ④ O K^+ no lado de fora liga-se agora a sítios de alta afinidade na porção extracelular da subunidade maior; ⑤ a enzima é desfosforilada, reduzindo sua afinidade para o K^-; e ⑥ o K^+ é descarregado no lado interno da célula. A proteína de transporte está agora pronta para um outro ciclo de bombeamento de Na^+ e K^+.

Pelo fato de três íons Na^+ se moverem para fora para cada dois íons de K^+ que se movem para dentro, o processo é eletrogênico — ele cria uma separação de cargas através da membrana. O resultado é um potencial transmembrana de –50 a –70mV (interior negativo em relação ao exterior), que é característico da maioria das células animais e essencial para a condução dos potenciais de ação nos neurônios. O papel central da ATPase Na^+K^+ é refletido na energia investida nessa única reação: cerca de 25% da energia total consumida no metabolismo de um homem em repouso.

Adendo 12-3 Um canal iônico defeituoso causa a fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária humana relativamente comum e séria. Cerca de 5% dos americanos brancos são portadores, possuindo uma cópia do gene defeituoso e outra normal. Apenas indivíduos com duas cópias do gene defeituoso apresentam os sintomas graves da doença: obstrução dos tratos gastrointestinal e respiratório, comumente levando à infecção bacteriana das vias aéreas e à morte em conseqüência de insuficiência respiratória, antes da idade de 30 anos. Na FC, a fina camada de muco que normalmente reveste as superfícies internas dos pulmões é anormalmente espessa, obstruindo o fluxo de ar e fornecendo um ancouradouro para a fixação das bactérias patogênicas, particularmente o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*.

O gene defeituoso nos pacientes com FC foi descoberto em 1989. Ele codifica uma proteína de membrana chamada de regulador da condutância transmembrana da fibrose cística, ou CTRF. A análise da hidropatia prediz que a CTRF possui 12 hélices transmembrana e é estruturalmente relacionada com os transportadores multidrogas dos tumores resistentes a drogas (Fig. 1). A proteína CTRF normal provou ser um canal iônico específico para o Cl$^-$. A atividade do canal de Cl$^-$ aumenta grandemente quando grupos fosforila são transferidos do ATP para várias cadeias laterais da proteína, catalisados pela proteína quinase dependente de cAMP (Capítulo 13). A mutação responsável pela FC em 70% dos casos resulta na deleção de um resíduo de Phe na posição 508, que leva a proteína mutante a não se enrolar nem se inserir corretamente na membrana plasmática. Outras mutações produzem uma proteína que é inserida apropriadamente, mas não consegue ser ativada pela fosforilação. Em cada caso, o problema fundamental é um canal de Cl$^-$ não funcional nas células epiteliais que revestem as vias aéreas (Fig. 2), o trato digestivo e as glândulas exócrinas (pâncreas, sudoríferas, ductos biliares e vaso deferente).

Normalmente, as células epiteliais que revestem a superfície interna dos pulmões secretam uma substância que prende e mata as bactérias, e os cílios da células epiteliais constantemente arrastam para fora os restos resultantes. De acordo com uma hipótese, a atividade bactericida requer uma concentração de NaCl relativamente baixa. Nos portadores de FC, o defeito da CFTR no canal de Cl$^-$ resulta em um fluido de superfície contendo uma alta concentração de NaCl, e esse fluido é muito menos efetivo em matar as bactérias. Infecções freqüentes por bactérias, como o *S. aureus* e a *P. aeruginosa*, progressivamente lesam os pulmões e reduzem a eficiência respiratória.

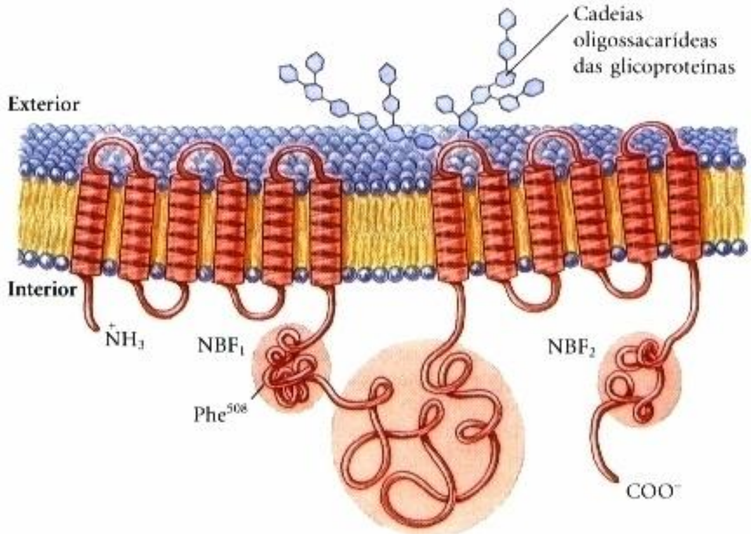


Figura 1 – Topologia do regulador da condutância transmembrana da fibrose cística, CFTR. Há 12 hélices transmembrana e três domínios funcionalmente significantes estendidos a partir da superfície citosólica: NBF_1 e NBF_2 são dobras de ligação de nucleotídeos aos quais o ATP se liga, e um domínio regulador (domínio R) é o sítio de fosforilação pela proteína quinase dependente de cAMP. As cadeias oligossacarídeas são ligadas a vários resíduos na superfície externa no segmento entre as hélices 7 e 8. A mutação que ocorre mais comumente levando à FC é a deleção de Phe^{508}, no domínio NBF_1. A estrutura da CFTR é muito semelhante à dos transportadores multidrogas dos tumores, descritos no texto.

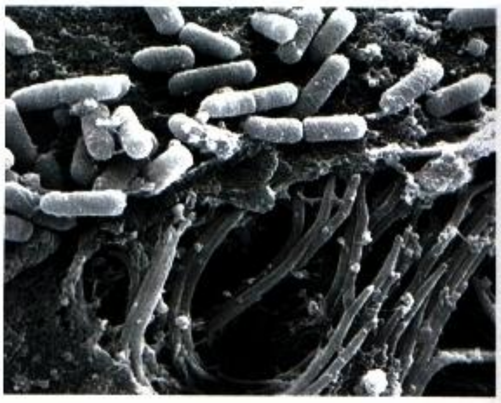
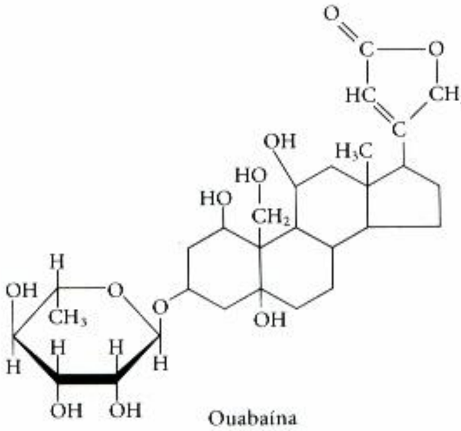


Figura 2 – O muco que reveste a superfície dos pulmões aprisiona bactérias. Nos pulmões saudáveis, essas bactérias são mortas e arrastadas para fora pela ação dos cílios. Na FC, a atividade bactericida é prejudicada, resultando em infecções recorrentes e lesão progressiva dos pulmões.

O derivativo esteróide ouabaína (do somali, *waa bayyo*, que significa "flecha envenenada") é um potente e específico inibidor da ATPase Na^+K^+. A ouabaína e outro derivativo esteróide, digitoxigenina, são os ingredientes ativos da digitalina, um extrato das folhas da planta dedaleira. A digitalina tem sido usada na medicina humana para tratar a insuficiência cardíaca congestiva. A inibição do efluxo de Na^+ pela digitalina leva a uma concentração maior de Na^+ nas células, ativando o contratransporte Na^+-Ca^{2+} no músculo cardíaco. O influxo aumentado do Ca^{2+} por meio desse contratransporte produz elevação de Ca^{2+} citosólico, que aumenta a contração do músculo cardíaco.



Ouabaína

Bombas de Ca^{2+} direcionadas por ATP mantêm baixa concentração de cálcio no citosol

A concentração citosólica de Ca^{2+} livre é geralmente de cerca de 100nM, bem abaixo da do meio circundante, seja água de lago ou plasma sangüíneo. A ubíqua ocorrência de fosfatos inorgânicos (P_i e PP_i) em concentrações milimolares no citosol necessita de uma baixa concentração citosólica, porque o íon fosfato se combina com o cálcio para formar fosfato de cálcio, relativamente insolúvel. Os íons cálcio são bombeados para fora do citosol por uma ATPase do tipo P, a **bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática**. Uma outra bomba de Ca^{2+} do tipo P no retículo endoplasmático movimenta Ca^{2+} para dentro da luz do ER, um compartimento separado do citosol. Nos miócitos, o Ca^{2+} normalmente é seqüestrado em uma forma especializada do retículo endoplasmático, chamada retículo sarcoplásmico. As bombas de Ca^{2+} do retículo endoplásmico e sarcoplásmico (SERCA, do inglês, "*s*arcoplasmic and *e*ndoplasmic *r*eticulum *ca*lcium") estão intimamente relacionadas na estrutura e no mecanismo, e ambas são inibidas pelo agente promotor de tumores, a tapsigargina, que não afeta a bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática.

A bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática e as bombas SERCA são proteínas integrais que oscilam entre duas conformações em um mecanismo semelhante àquele da ATPase Na^+K^+ (Fig. 12-34). A bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplásmico, que compreende 80% das proteínas naquela membrana, tem sido bem caracterizada e é o protótipo para as bombas de Ca^{2+} do tipo P. Ela consiste de um único polipeptídeo (M_r ~100.000) que atravessa a membrana dez vezes. Um grande domínio citosólico inclui um sítio para a ligação do ATP e um resíduo Asp, o qual sofre fosforilação reversível pelo ATP. A fosforilação favorece uma conformação com um sítio de ligação ao Ca^{2+} de alta afinidade, exposto no lado citosólico, e a desfosforilação favorece uma conformação com um sítio de ligação ao Ca^{2+} de baixa afinidade, no lado luminal. Como resultado das alterações cíclicas na conformação, o transportador liga Ca^{2+} no lado da membrana em que a concentração de Ca^{2+} é baixa e libera-o no lado em que a concentração é maior. Dessa forma, a energia liberada pela hidrólise do ATP em ADP e P_i, durante um ciclo fosforilação-desfosforilação, direciona o Ca^{2+} através da membrana contra um grande gradiente eletroquímico.

Gradientes iônicos fornecem a energia para o transporte secundário ativo

Os gradientes iônicos formados pelo transporte primário de Na^+ ou H^+ podem, eles próprios, fornecer a força direcionadora para o transporte duplo de outros solutos. Muitas células contêm os sistemas de transporte que acoplam o fluxo espontâneo a favor do gradiente desses íons ao bombeamento simultâneo contra o gradiente de um outro íon, açúcar ou aminoácido (Tabela 12-5). O transportador galactosídeo da *E. coli*, por exemplo, permite o acúmulo de lactose em níveis 100 vezes maiores que a concentração no meio de crescimento circundante (Fig. 12-35). A *E. coli* normalmente possui um gradiente de prótons e carga através de sua membrana plasmática, produzido pelo metabolismo produtor de energia; os prótons tendem a fluir de volta espontaneamente para dentro da célula a favor de seu gradiente eletroquímico. A bicamada de lipídio é impermeável aos prótons, mas o transportador de galactosídeo fornece uma via para a reentrada do próton, e a lactose é simultaneamente transportada para dentro da célula pelo co-transporte. O acúmulo endergônico da lactose é, portanto, acoplado ao fluxo exergônico dos prótons; a alteração da energia livre global para o processo acoplado é negativa.

Nas células do epitélio intestinal, a glicose e certos aminoácidos são acumulados pelo co-transporte com o Na^+, usando o gradiente de Na^+ estabelecido pela ATPase Na^+K^+ da membrana plasmática (Fig. 12-36). A superfície apical das células do epitélio intestinal é coberta com microvilosidades, longas e finas projeções da membrana plasmática, que aumentam grandemente a área da superfície exposta do conteúdo intestinal. Os co-transportadores Na^+ e a glicose na membrana plasmática apical captam glicose do intestino em um processo direcionado pelo fluxo de Na^+, a favor do gradiente:

$$2\,Na^+_{fora} + glicose_{fora} \longrightarrow 2\,Na^+_{dentro} + glicose_{dentro}$$

Tabela 12-5 – Sistemas de transporte duplo direcionados pelos gradientes de Na^+ ou H^+

Organismo ou tecido	Transporte do soluto (movendo contra seu gradiente)	Soluto transportado conjuntamente (a favor de seu gradiente)	Tipo do transporte
E. coli	Lactose	H^+	Co-transporte
	Prolina	H^+	Co-transporte
	Ácidos dicarboxílicos	H^+	Co-transporte
Intestino, rim dos vertebrados	Glicose	Na^+	Co-transporte
	Aminoácidos	Na^+	Co-transporte
Células de vertebrados (muitos tipos)	Ca^{2+}	Na^+	Contratransporte
Plantas superiores	K^+	H^+	Contratransporte
Fungos (*Neurospora*)	K^+	H^+	Contratransporte

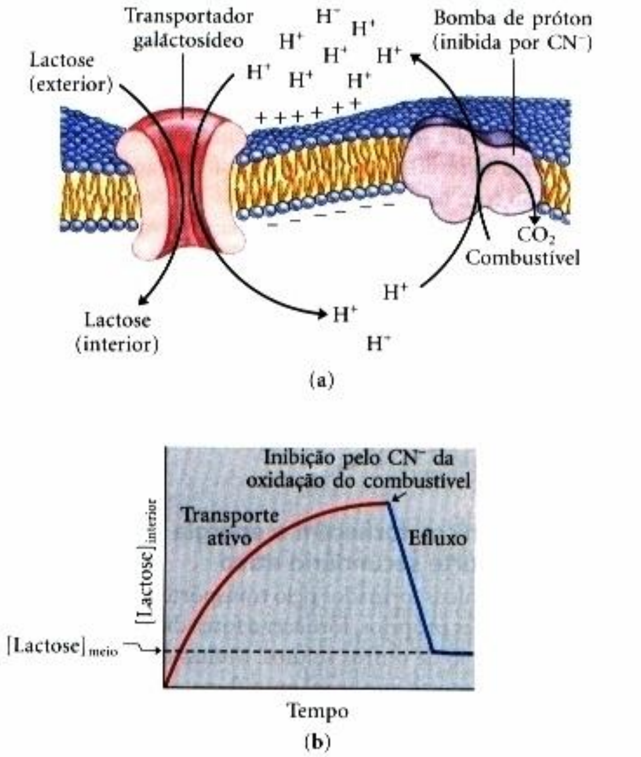

Transportador galáctosídeo
Lactose (exterior)
H⁺
Bomba de próton (inibida por CN⁻)
+ + + + + +
− − − − − −
CO₂
Combustível
Lactose (interior)
(a)
Inibição pelo CN⁻ da oxidação do combustível
Transporte ativo
Efluxo
[Lactose]interior
[Lactose]meio
Tempo
(b)

Figura 12-35 – Captação de lactose na *E. coli*. (**a**) O transporte primário de H^+ para fora da célula, direcionado pela oxidação de uma variedade de combustíveis, estabelece tanto um gradiente de prótons como um potencial elétrico (interior negativo) por meio da membrana. O transporte ativo secundário da lactose para dentro da célula envolve o co-transporte de H^+ e lactose pelo transportador galactosídeo. A captação da lactose contra o seu gradiente de concentração é inteiramente dependente desse influxo de H^+, direcionado pelo gradiente eletroquímico. (**b**) Quando as reações oxidativas produtoras de energia do metabolismo são bloqueadas pelo cianeto (CN^-), o transportador galactosídeo permite o equilíbrio da lactose dentro e fora da célula pelo transporte passivo. A linha tracejada representa a concentração da lactose no meio circundante.

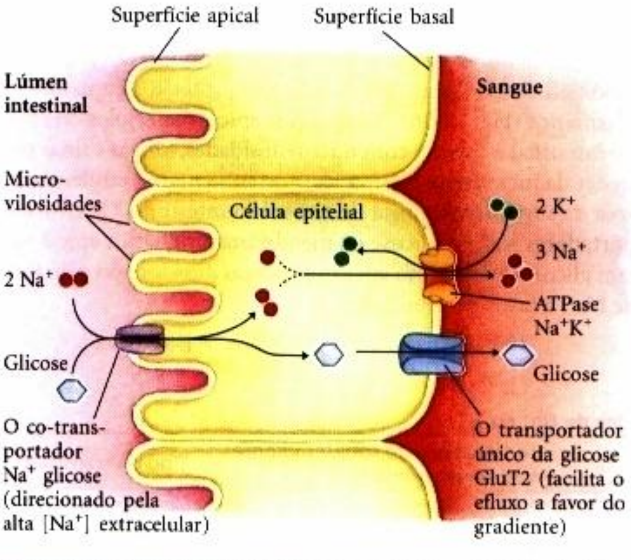

Superfície apical
Superfície basal
Lúmen intestinal
Sangue
Micro-vilosidades
Célula epitelial
2 K⁺
3 Na⁺
2 Na⁺
ATPase Na⁺K⁺
Glicose
Glicose
O co-transportador Na⁺ glicose (direcionado pela alta [Na⁺] extracelular)
O transportador único da glicose GluT2 (facilita o efluxo a favor do gradiente)

Figura 12-36 – Transporte da glicose nas células epiteliais do intestino. A glicose é transportada juntamente com o Na^+ através da membrana plasmática apical para dentro da célula epitelial. Ela se movimenta dentro da célula até a superfície basal, na qual passa para o sangue via GluT2, um transportador passivo da glicose. A ATPase Na^+K^+ continua a bombear Na^+ para fora, para manter o gradiente de Na^+ que direciona a captação de glicose.

A energia requerida para esse processo vem de duas fontes: a maior concentração de Na^+ do lado de fora que do de dentro (o potencial químico) e o potencial transmembrana (o potencial elétrico), que é negativo internamente e, portanto, puxa o Na^+ para dentro. O potencial eletroquímico do Na^+ é:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[Na^+]_{dentro}}{[Na^+]_{fora}} + n\,\mathcal{F}\,\Delta E$$

onde $n = 2$, o número de íons Na^+ transportados juntamente com a molécula de glicose. Considerando o potencial de membrana típico de −50mV, uma $[Na^+]$ intracelular de 12mM e uma $[Na^+]$ extracelular de 145mM, a energia, ΔG, tornada disponível como dois íons Na^+, que reentram na célula, é −25kJ, suficiente para bombear a glicose contra um grande gradiente de concentração.

$$\Delta G = -25\text{kJ} = RT \ln \frac{[\text{glicose}]_{dentro}}{[\text{glicose}]_{fora}}$$

$$\frac{[\text{glicose}]_{dentro}}{[\text{glicose}]_{fora}} = 30.000$$

Ou seja, o transportador duplo pode bombear glicose para dentro até que sua concentração dentro da célula epitelial seja até 30.000 vezes aquela no intestino. À medida que a glicose é bombeada do intestino para dentro da célula epitelial na superfície apical, ela é simultaneamente transportada da célula para o sangue pelo transporte passivo por meio de um transportador de glicose (GluT2) na superfície basal (Fig. 12-36). O papel crucial do Na^+ nos sistemas de co-transporte e contratransporte, como esses, requer o bombeamento contínuo do Na^+ para fora, para manter o gradiente transmembrana de Na^+.

Por causa do papel essencial dos gradientes iônicos no transporte ativo e na conservação da energia, compostos que colapsam os gradientes iônicos através da membrana celular são venenosos, e aqueles que são específicos para os microrganismos infecciosos podem servir como antibióticos. A valinomicina é um peptídeo cíclico pequeno, que circunda o K^+ e neutraliza sua carga positiva (Fig. 12-37). O peptídeo então age como uma via de mão dupla, transportando o K^+ através da membrana a favor do seu gradiente de concentração e reduzindo aquele gradiente. Compostos que conduzem íons através da membrana dessa forma são chamados de **ionóforos**, literalmente "portadores de íons". Tanto a valinomicina como a monensina (um ionóforo que carrega Na^+) são antibióticos, elas matam as células microbianas rompendo seus processos transportadores secundários e as reações conservadoras de energia.

Canais iônicos seletivos permitem a rápida movimentação de íons através das membranas

Reconhecido primeiro nos neurônios e agora sabidamente presentes nas membranas plasmáticas de todas as células, bem como nas membranas intracelulares dos eucariotos, o **canal iônico seletivo** é um outro mecanismo para a movimentação de íons inorgânicos através da membrana. Os canais iônicos determinam a permeabilidade a íons específicos da membrana plasmática e, juntamente com as bombas como a ATPase Na^+K^+, regulam as concentrações citosólicas dos íons e o potencial da membrana. Nos neurônios, alterações muito rápidas na atividade dos canais iônicos induzem alterações no potencial de membrana — os potenciais de ação — que transportam sinais de uma extremidade de um neurônio para a outra. Nos miócitos, a rápida abertura dos canais de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático libera Ca^{2+} o qual desencadeia a contração muscular. Discutiremos as funções de sinalização dos canais iônicos no Capítulo 13. Aqui

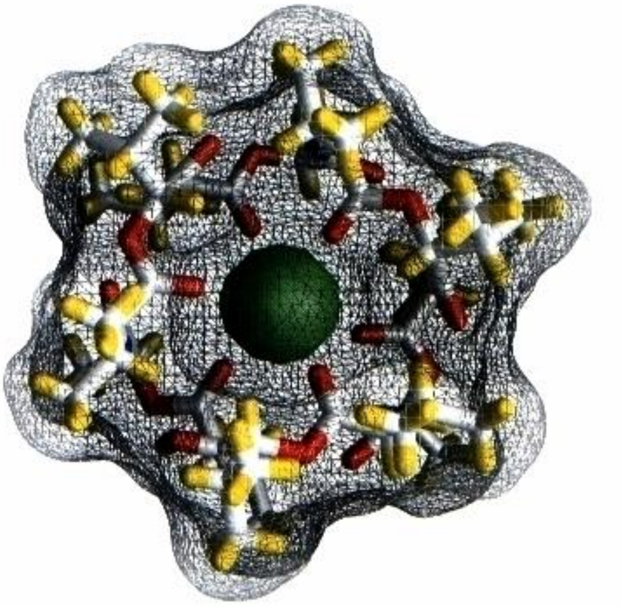


Figura 12-37 – Valinomicina, um ionóforo peptídeo que liga K^+. Nesta imagem, são mostradas como rede transparente as superfícies de contorno, através das quais uma estrutura de vareta do peptídeo e um átomo de K^+ (verde) são visíveis. Os átomos de oxigênio (vermelho) que ligam K^+ são parte de uma cavidade hidrofílica central. As cadeias laterais dos aminoácidos hidrofóbicos (amarelo) cobrem o lado de fora da molécula. Pelo fato de o exterior do complexo valinomicina-K^+ ser hidrofóbico, o complexo se difunde através da membrana, transportando K^+ a favor de seu gradiente de concentração. A resultante dissipação do gradiente iônico transmembrana mata as células microbianas tornando a valinomicina um potente antibiótico.

descreveremos as bases estruturais da função do canal iônico, usando como exemplo um canal bacteriano de K^+, o canal iônico do receptor da acetilcolina e os canais de Na^+ dependentes de voltagem dos neurônios.

Canais iônicos se distinguem dos transportadores de íons em, pelo menos, três maneiras. Primeiro, a velocidade do fluxo através dos canais pode ser de várias ordens de grandeza maior que o número de renovação para um transportador — 10^7 a 10^8 íons por canal por segundo, próximo da velocidade máxima teórica para a difusão irrestrita. Segundo, os canais iônicos não são saturáveis; suas velocidades não se aproximam de um máximo a altas concentrações de substrato. Terceiro, eles são "dependentes" — abertos ou fechados em resposta a algum evento celular. Nos **canais dependentes de ligante** (que são oligoméricos em geral), a ligação de alguma pequena molécula extracelular ou intracelular força uma transição alostérica na proteína, que abre ou fecha o canal. Nos **canais iônicos dependentes de voltagem,** um domínio protéico carregado se move em relação à membrana em resposta a uma alteração no potencial elétrico transmembrana, induzindo o canal iônico a se abrir ou se fechar. A dependência quer de ligantes quer de potencial de membrana pode ser muito rápida. Um canal típico se abre em uma fração de 1milissegundo e pode permanecer aberto por apenas milissegundos, tornando esses dispositivos moleculares efetivos para a transmissão de sinais muito rápidos no sistema nervoso.

A estrutura de um canal de K^+ mostra a base de sua especificidade iônica

A estrutura de um canal de potássio da bactéria *Streptomyces lividans*, determinada por cristalografia de raios X em 1998, fornece muitas informações sobre a maneira como funcionam os canais iônicos. Esse canal iônico bacteriano é relacionado em seqüência a todos os outros canais de K^+ conhecidos e funciona como protótipo para tais canais, incluindo o canal de potássio dependente de voltagem dos neurônios descritos no próximo capítulo. Entre os membros dessa família protéica, as semelhanças em seqüência são maiores na "região do poro", que contém o filtro de seletividade iônica que permite ao K^+ (raio 1,33Å) passar 10.000 vezes mais facilmente que o Na^+ (raio 0,95Å), a uma velocidade (cerca de 10^8 íons por segundo) que se aproxima do limite teórico para a difusão sem restrições.

O canal de K^+ consiste de quatro subunidades idênticas que atravessam a membrana e formam um cone que circunda o canal iônico, com a extremidade maior deste voltada para o espaço extracelular (Fig. 12-38). Cada subunidade possui duas α-hélices transmembrana, bem como uma terceira hélice curta que contribui para a região do poro. O cone externo é formado por uma das hélices transmembrana de cada subunidade. O cone interno, formado pelas outras quatro hélices transmembrana, circundam o canal iônico e dão origem ao filtro de seletividade iônica.

Tanto a especificidade iônica como o alto fluxo através do canal são compreensíveis a partir da estrutura do canal. Nas superfícies interna e externa da membrana plasmática, as entradas do canal possuem vários resíduos de aminoácidos carregados negativamente, que presumivelmente aumentam a concentração local dos cátions como o K^+ e o Na^+. A via iônica através da membrana inicia-se (na superfície interna) como um canal largo e cheio de água no qual o íon retém sua esfera de hidratação. Uma próxima estabilização é fornecida pelas α-hélices curtas na região do poro de cada subunidade, com as seus carboxiterminais e as cargas negativas parciais associados apontando ao K^+ no canal. A cerca de dois terços do caminho através da membrana, esse canal se estreita na região do filtro de seletividade, forçando o íons a desistir de suas moléculas de água de hidratação. Os átomos de oxigênio da carbonila no esqueleto do filtro de seletividade substitui as moléculas de água na esfera de hidratação do K^+, formando uma série de camadas de coordenação perfeita através da qual o K^+ se move. Essa interação favorável com o filtro não é possível com o Na^+, que é muito pequeno para fazer os contatos com todos os potenciais oxigênios ligantes. A estabilização preferencial do K^+ é a base para a seletividade iônica do filtro, e mutações que alteram resíduos nessa parte da proteína eliminam a seletividade iônica do canal.

Os íons K^+ passam através do filtro em fila única. Na estrutura cristalográfica, dois íons K^+ são visíveis, um a cada extremidade do filtro de seletividade, separados cerca de 7,5Å. Sua repulsão eletrostática mútua parece balancear a interação de cada um com o filtro de seletividade e os mantém movimentando-se rapidamente.

Outros canais de K^+ são semelhantes em seqüência e, presumivelmente, em estrutura e mecanismo ao canal de K^+ do *S. lividans*. Por exemplo, o produto do gene Shaker, que é um canal de K^+ em drosófila e os canais de K^+ do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, o protozoário ciliado *Paramecium* e a planta *Arabidopsis thaliana*, todos possuem seqüências muito semelhantes àquela da região do poro do canal de K^+ de *S. lividans*. Além disso, as seqüências de aminoácidos dos canais de K^+ e Na^+ sugerem que eles também compartilham alguma semelhança estrutural e funcioanl com o canal de K^+ bacteriano. A determinação dessa estrutura do canal foi, portanto, um marco na bioquímica do canal.

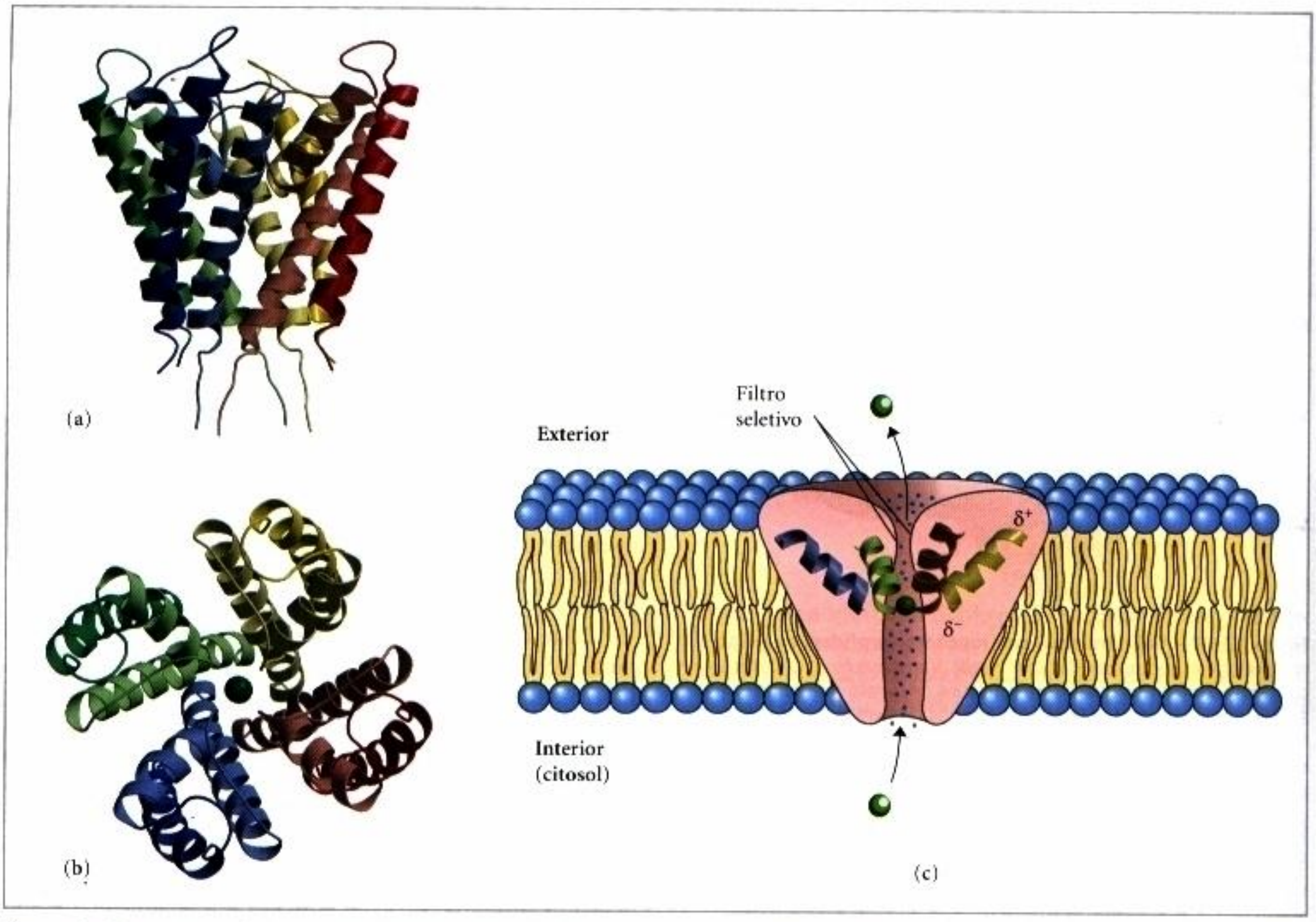
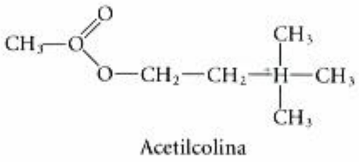


Figura 12-38 – Estrutura do canal de K$^+$ do *Streptomyces lividans*. (**a**) Visto no plano da membrana, o canal consiste de oito hélices transmembrana (duas de cada quatro subunidades idênticas), formando um cone com sua extremidade larga na direção do espaço extracelular. As hélices internas do cone (coloridas brilhantes) revestem o canal transmembrana, e as hélices externas interagem com a camada lipídica. Segmentos curtos de cada subunidade convergem na extremidade aberta do cone para fazer um filtro de seletividade. (**b**) Esta vista é perpendicular ao plano da membrana e mostra as quatro subunidades arranjadas em volta de um canal central suficientemente largo para passar um único íon K$^+$. Os oxigênios carbonila no esqueleto peptídico se projetam para dentro do canal, interagindo com um íon K$^+$ que passa, estabilizando-o. Esses ligantes estão perfeitamente posicionados para interagir com o K$^+$, mas não com os íons Na$^+$, menores. Essa interação preferencial com o K$^+$ é a base para a seletividade do canal iônico. (**c**) Secção transversal mostrando o canal relativamente largo e preenchido com água no lado citosólico (pontos azuis). Nesta região, um íon K$^+$ (verde) é estabilizado pela hidratação e pelas cargas negativas das extremidades carboxiterminais de hélices curtas que se projetam das quatro subunidades. O canal se estreita no filtro de seletividade, no qual a água de hidratação é tirada do K$^+$ e substituída pelos oxigênios carbonilas do filtro de seletividade.

O receptor de acetilcolina é um canal iônico dependente de um ligante

Um outro canal iônico muito bem estudado é o **receptor nicotínico da acetilcolina**, que é essencial na passagem de um sinal elétrico de um neurônio motor até uma fibra muscular na junção neuromuscular (sinalizando ao músculo para contrair). (Receptores nicotínicos foram originalmente distinguidos dos receptores muscarínicos pela sensibilidade do primeiro à nicotina, e do último ao alcalóide do cogumelo a muscarina.) A acetilcolina liberada pelo neurônio motor difunde-se uns poucos micrômetros até a membrana plasmática de um miócito, na qual se liga ao receptor da acetilcolina. Isso força a uma alteração no receptor, induzindo o canal intrínseco do receptor a se abrir. A movimentação resultante de cargas positivas para dentro da célula despolariza a membrana plasmática do miócito, desencadeando a contração. O receptor da acetilcolina permite que Na$^+$, Ca^{2+} e K$^+$ passem com igual facilidade, mas outros cátions e todos os ânions são incapazes de passar.



$$CH_3{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{CH_3}{\underset{CH_3}{\overset{+}{N}}}{-}CH_3$$

Acetilcolina

A movimentação de Na$^+$ através de um canal iônico receptor da acetilcolina é insaturável (sua velocidade é proporcional à concentração extracelular do Na$^+$) e muito rápida — cerca de 2×10^7 íons Na$^+$ por segundo em condições fisiológicas.

Esse canal receptor é típico de muitos outros canais iônicos que produzem ou respondem a sinais elétricos: ele possui uma "entrada" que se abre em resposta à estimulação pela acetilcolina e um mecanismo de tempo intrínseco que fecha a entrada depois de um segundo. Assim, o sinal acetilcolina é transitório — uma característica essencial para a condução do sinal elétrico. As alterações estruturais subjacentes à abertura no receptor da acetilcolina são conhecidas, mas o mecanismo de "dessensibilização" — de fechamento da entrada mesmo na presença continuada da acetilcolina — não é bem conhecido.

O receptor nicotínico da acetilcolina (estrutural e funcionalmente distinto dos receptores muscarínicos da acetilcolina) é composto de cinco subunidades: cópias únicas das subunidades β, γ, e δ, e duas subunidades α idênticas, cada uma com um sítio de ligação à acetilcolina. Todas as cinco subunidades são relacionadas em seqüência e na estrutura terciária, cada uma possuindo quatro segmentos helicoidais transmembrana (M1 a M4) (Fig. 12-39a). As cinco subunidades envolvem um poro central, que é revestido com suas hélices M2. O poro tem cerca de 20Å de largura nas partes do canal que se projetam nas superfícies citosólicas e extracelulares, mas se estreita à medida que atravessa a bicamada lipídica. Próximo do centro da bicamada está um anel volumoso hidrofóbico das cadeias laterais de Leu das hélices M2, posicionadas tão juntas que previnem a passagem de íons através do canal. Alterações conformacionais alostéricas induzidas pela ligação da acetilcolina às duas subunidades α incluem uma leve torção das hélices M2 (Fig. 12-39b), que puxa essas cadeias laterais hidrofóbicas do centro do canal e o abre à passagem dos íons.

Com base nas semelhanças entre as seqüências de aminoácidos de outros canais iônicos dependentes de ligantes e o receptor da acetilcolina, os canais receptores que respondem a sinais extracelulares do ácido γ-aminobutírico (GABA), glicina e sero-

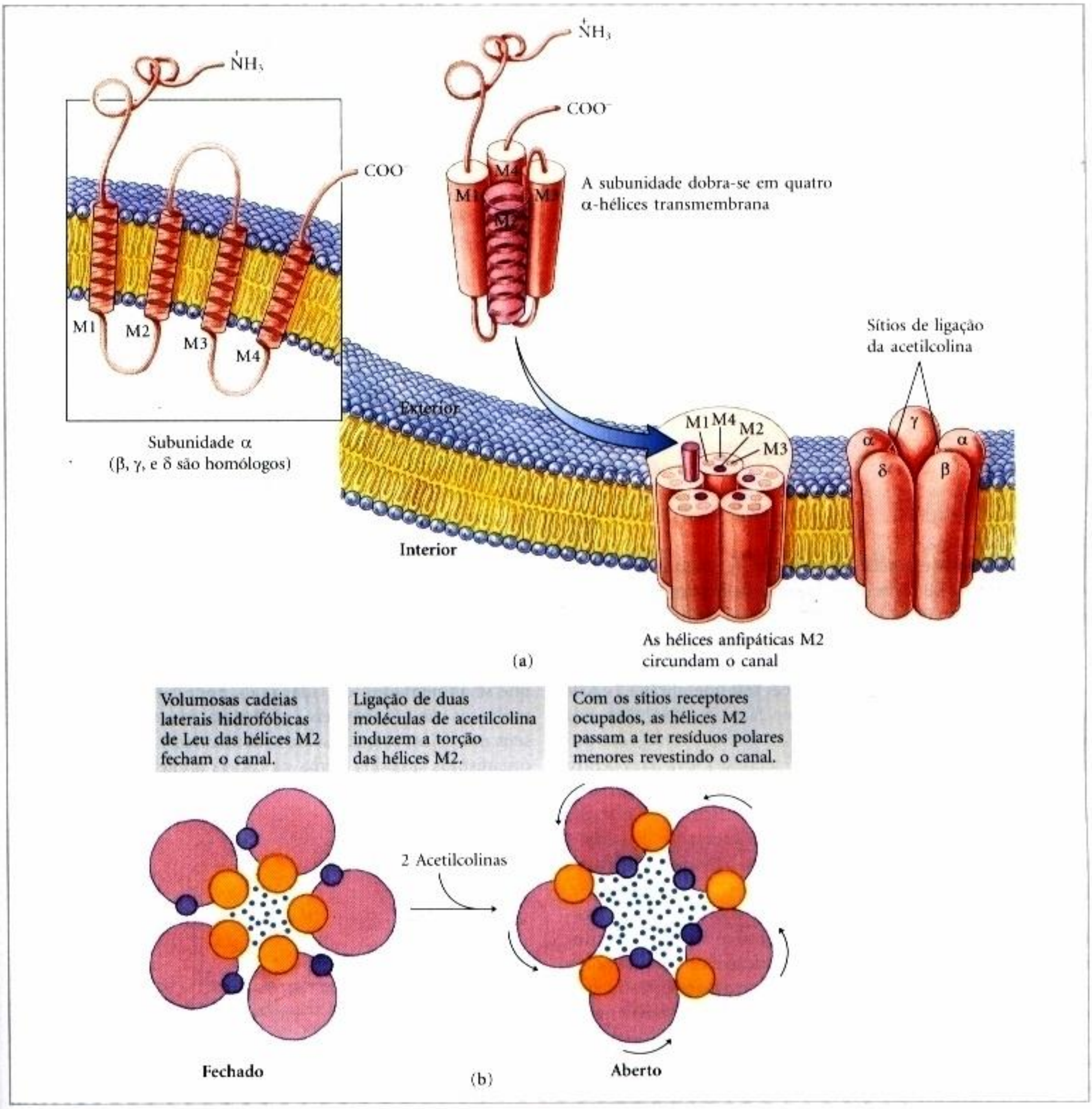

$\overset{+}{N}H_3$
COO^-
$\overset{+}{N}H_3$
COO^-
M1
M2
M3
M4
A subunidade dobra-se em quatro α-hélices transmembrana
M1
M2
M3
M4
Subunidade α
(β, γ, e δ são homólogos)
Exterior
Interior
M1 M4 M2
M3
Sítios de ligação da acetilcolina
α
γ
α
δ
β
As hélices anfipáticas M2 circundam o canal
(a)
Volumosas cadeias laterais hidrofóbicas de Leu das hélices M2 fecham o canal.
Ligação de duas moléculas de acetilcolina induzem a torção das hélices M2.
Com os sítios receptores ocupados, as hélices M2 passam a ter resíduos polares menores revestindo o canal.
2 Acetilcolinas
Fechado
Aberto
(b)

Figura 12-39 – Estrutura do canal iônico do receptor da acetilcolina. (**a**) Cada uma das cinco subunidades ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) possui quatro hélices transmembrana, M1 a M4. As hélices M2 são anfipáticas, as outras possuem principalmente resíduos hidrofóbicos. As cinco subunidades estão arranjadas em volta de um canal transmembrana central, que é revestido com os lados polares das hélices M2. No topo e no fundo do canal estão anéis de resíduos de aminoácidos carregados negativamente. Próximo do meio da bicamada, cinco cadeias laterais de Leu (uma para cada hélice M2) se projetam para dentro do canal, constringindo-o a um diâmetro tão pequeno, insuficiente para permitir a passagem de íons como Ca^{2+}, Na^+ e K^+. (**b**) Esta visão do topo de uma secção transversal que passa pelo centro das hélices M2 mostra o bloqueio do canal pelas cadeias laterais volumosas de Leu. Quando ambos os sítios do receptor da acetilcolina (um de cada lado da subunidade α) são ocupados, ocorre uma alteração conformacional. À medida que as hélices M2 se contorcem levemente, os cinco resíduos de Leu rodam para fora do canal e são substituídos por resíduos polares menores. Esse mecanismo de entrada abre o canal, permitindo a passagem de Ca^{2+}, Na^+ ou K^+.

tonina são classificados em uma superfamília de receptores da acetilcolina e provavelmente compartilham a estrutura tridimensional e os mecanismos de abertura. Os receptores do GABA e da glicina são canais aniônicos específicos para Cl^- ou HCO_3^-, enquanto o receptor da serotonina é cátion-específico. As subunidades de cada um desses canais, da mesma forma que dos receptores de acetilcolina, possuem quatro segmentos helicoidais transmembrana e formam canais oligoméricos.

Uma segunda classe de canais iônicos dependentes de ligantes responde a **ligantes** *intracelulares*: guanosina mononucleotídica cíclica 3′, 5′ (cGMP) no olho de vertebrados, cGMP e cAMP nos neurônios olfativos e ATP e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) em muitos tipos celulares. Esses canais são compostos de subunidades múltiplas, cada uma com seis domínios helicoidais transmembrana. Discutiremos esses canais no contexto de suas funções sinalizadoras no Capítulo 13.

O canal neuronal de Na^+ é um canal iônico dependente de voltagem

Os canais de Na^+ nas membranas plasmáticas dos neurônios e dos miócitos do músculo cardíaco e esquelético sensoriam gradientes elétricos através da membrana e respondem abrindo-se ou fechando-se. Esses **canais iônicos dependentes de voltagem** são tipicamente muito mais sensíveis ao Na^+ que a outros cátions mono ou divalentes (100 ou mais vezes) e possuem uma velocidade de fluxo muito alta (> 10^7 íons por segundo). Normalmente, na conformação fechada, os canais de Na^+ são ativados (abertos) pela redução no potencial elétrico transmembrana. Eles, então, sofrem uma inativação muito rápida. Dentro de milissegundos de abertura, os canais se fecham e permanecem inativos por muitos milissegundos. A ativação seguida pela inativação dos canais de Na^+ é a base da sinalização por neurônios (Capítulo 13).

O componente essencial dos canais de Na^+ é um único e grande polipeptídeo (1.840 resíduos de aminoácidos) organizado em quatro domínios (Fig. 12-40) agrupados ao redor de um canal central, fornecendo uma via para o Na^+ através da membrana. Aquela via é tornada Na^+ específica por uma "região do poro" composta de segmentos entre as hélices transmembrana 5 e 6 de cada domínio, que se dobra dentro do canal. A hélice 4 de cada domínio possui uma alta densidade de resíduos carregados positivamente. Acredita-se que esse segmento se mova para dentro da membrana em resposta a alterações na voltagem transmembrana, a partir do potencial de repouso de cerca de -60mV (interior negativo) a cerca de $+30$mV. A movimentação da hélice 4 desencadeia a abertura do canal, e isso é a base para a abertura pela voltagem.

Acredita-se que a inativação do canal ocorra por um mecanismo de bola-e-cadeia. Um domínio protéico na superfície citosólica do canal de Na^+, chamado de inativação da entrada (a bola), é amarrada ao canal por um segmento curto do polipeptídeo (a cadeia) (Fig. 12-40b). Esse domínio é livre para se mover quando o canal está fechado, mas, quando ele se abre, um sítio na face interna do canal torna-se disponível para se ligar à bola amarrada, bloqueando o canal. O comprimento da amarra parece determinar quanto um canal iônico permanece aberto; quanto maior a amarra, maior o período de abertura. A inativação de outros canais iônicos pode ocorrer por mecanismo semelhante.

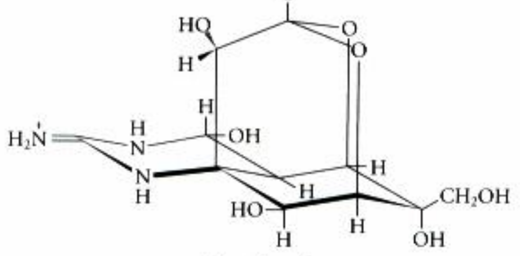
A função canal iônico é medida eletricamente

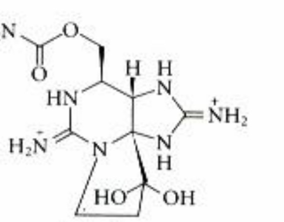
Um único canal iônico tipicamente permanece aberto por apenas uns poucos milissegundos, além do limite da maioria das medidas bioquímicas. Fluxos iônicos devem, portanto, ser medidos eletricamente, ou como alterações na V_m (na ordem de milissegundos) ou como correntes elétricas I (na ordem de microamperes ou picoamperes), usando microelétrodos e amplificadores apropriados (Fig. 12-41). O pinçamento da membrana ("patch-clamping"), uma técnica, na qual correntes muito pequenas são medidas dentro de uma região minúscula da superfície da membrana contendo apenas uma ou umas poucas moléculas do canal iônico, revela que 10^4 íons podem mover-se através de um único canal iônico em um milissegundo. Isso representa uma imensa amplificação do sinal inicial; para o receptor da acetilcolina, por exemplo, o sinal pode ter sido apenas umas poucas moléculas de acetilcolina.

Canais iônicos defeituosos podem apresentar conseqüências fisiológicas surpreendentes

A importância dos canais iônicos para os processos fisiológicos é clara a partir dos efeitos das mutações em proteínas específicas de canais iônicos. Defeitos genéticos nos canais de Na^+ dependentes de voltagem dos miócitos da membrana plasmática resultam em doenças nas quais os músculos são, periodicamente, ou paralisados (como na paralisia periódica hipercalêmica) ou rígidos (como na paramiotonia congênita). Como assinalado anteriormente, a fibrose cística é o resultado de uma mutação que altera um aminoácido na proteína CFTR, um canal iônico de cloreto. O processo defeituoso aqui não é a neurotransmissão, mas a secreção por várias células de glândulas exócrinas cujas atividades são ligadas aos fluxos do íon Cl^-.

Toxinas que ocorrem naturalmente com freqüência agem sobre os canais iônicos, e a potência dessas toxinas ilustra a importância da função normal do canal iônico. A **tetrodotoxina** (produzida pelo peixe-bola, *Spheroides rubripes*) e a **saxitoxina** (produzida pelo dinoflagelado marinho *Gonyaulax*, que causa o fenômeno ocasional das "marés vermelhas") são venenos que agem pela ligação aos canais de Na^+ dependentes de voltagem dos neurônios, prevenindo os potenciais de ação normais. O peixe-bola é um ingrediente da guloseima japonesa "fugu", que deve ser preparada por chefes especialmente treinados para separar a porção suculenta da do veneno mortal. Comer moluscos que se alimentaram de *Gonyaulax* pode também ser fatal; os moluscos não são sensíveis à saxitoxina, mas concentram-na em seus músculos, os quais se tornam altamente venenosos para os organismos situados acima na cadeia alimentar. O veneno da


Tetrodotoxina


Saxitoxina

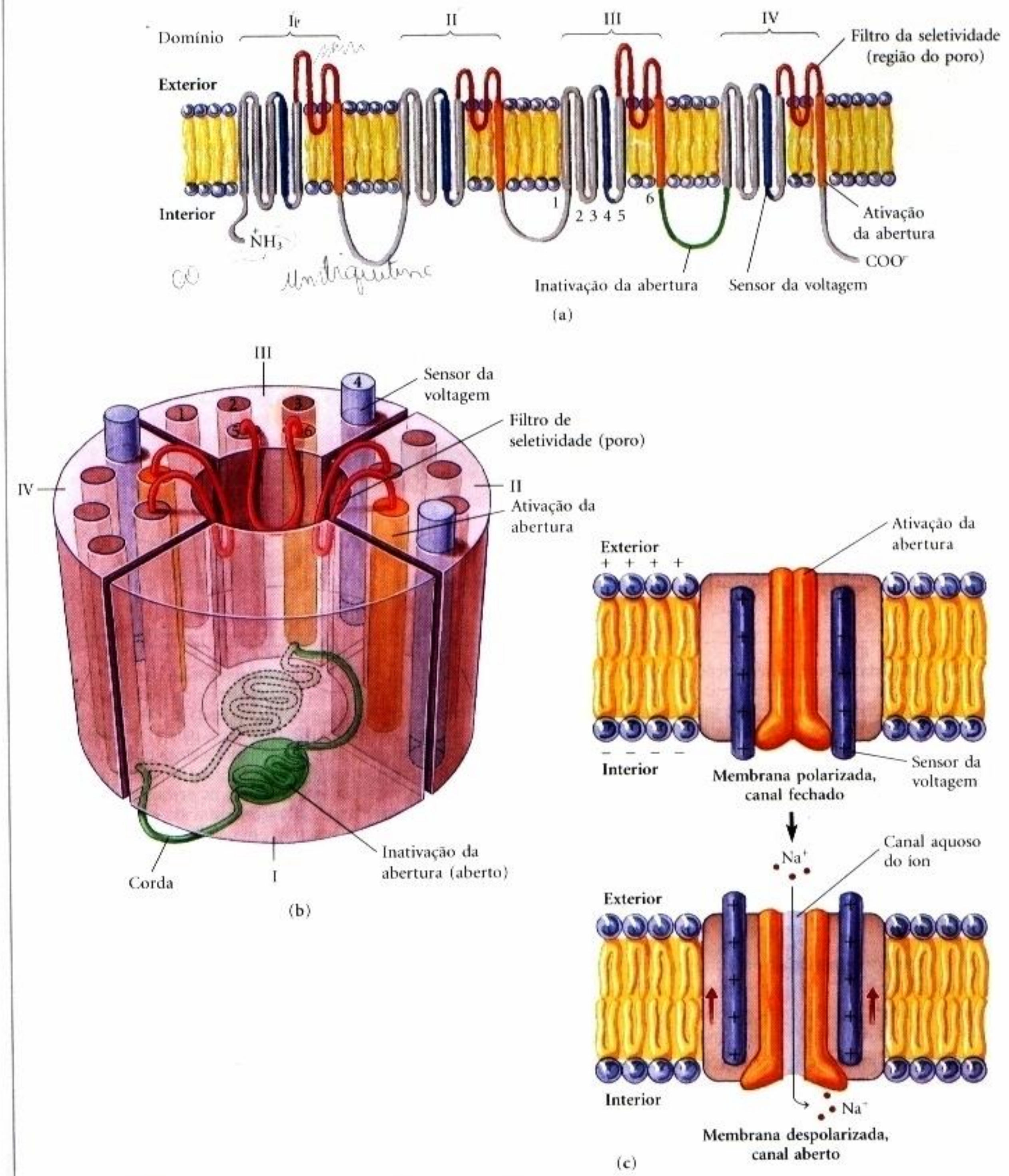

Domínio
I
II
III
IV
Filtro da seletividade (região do poro)
Exterior
Interior
$\overset{+}{N}H_3$
1
2 3 4 5
6
Ativação da abertura
COO^-
Inativação da abertura
Sensor da voltagem
CC
Unbiquitina
(a)
III
4
Sensor da voltagem
1
2
3
5
6
Filtro de seletividade (poro)
IV
II
Ativação da abertura
Inativação da abertura (aberto)
Corda
I
(b)
Ativação da abertura
Exterior
+ + + +
Interior
− − − −
Membrana polarizada, canal fechado
Sensor da voltagem
Na^+
Canal aquoso do íon
Exterior
Interior
Na^+
Membrana despolarizada, canal aberto
(c)

Figura 12-40 – Canais de Na^+ dos neurônios abertos por voltagem. Os canais de sódio dos vários tecidos e organismos possuem uma variedade de subunidades, mas apenas a subunidade principal (α) é essencial. (**a**) A subunidade α é uma grande proteína com quatro domínios homólogos (I a IV), cada um contendo seis hélices transmembrana. A hélice 4 em cada domínio (azul) é o sensor da voltagem; a hélice 6 (laranja) acredita-se que seja a ativação da entrada. Os segmentos entre as hélices 5 e 6, a região do poro (vermelho), formam o filtro da seletividade, e o segmento conectando os domínios III e IV (verde) é a inativação da entrada. (**b**) Os quatro domínios são arranjados em volta de um canal transmembrana central revestido com resíduos de aminoácidos polares. Os segmentos unindo as hélices 5 e 6 (vermelho) em cada domínio chegam juntos próximos da superfície extracelular para formar o filtro de seletividade, que é conservado em todos os canais de Na^+. O filtro dá ao canal a sua habilidade de discriminar entre o Na^+ e outros íons de tamanho semelhante. A inativação da entrada (verde) se fecha (linhas tracejadas) logo depois que que a ativação da entrada se abre. (**c**) Mecanismo sensível à voltagem envolve a movimentação da hélice 4 (azul) perpendicular ao plano da membrana em resposta a uma alteração no potencial transmembrana. A carga fortemente positiva na hélice 4 permite que ela seja puxada para dentro em resposta ao potencial de membrana negativo no interior (V_m). A despolarização diminui esse puxamento e a hélice 4 relaxa movimentando-se para fora. Esse movimento é comunicado à ativação da entrada (laranja), induzindo alterações conformacionais que abrem o canal em resposta à despolarização.

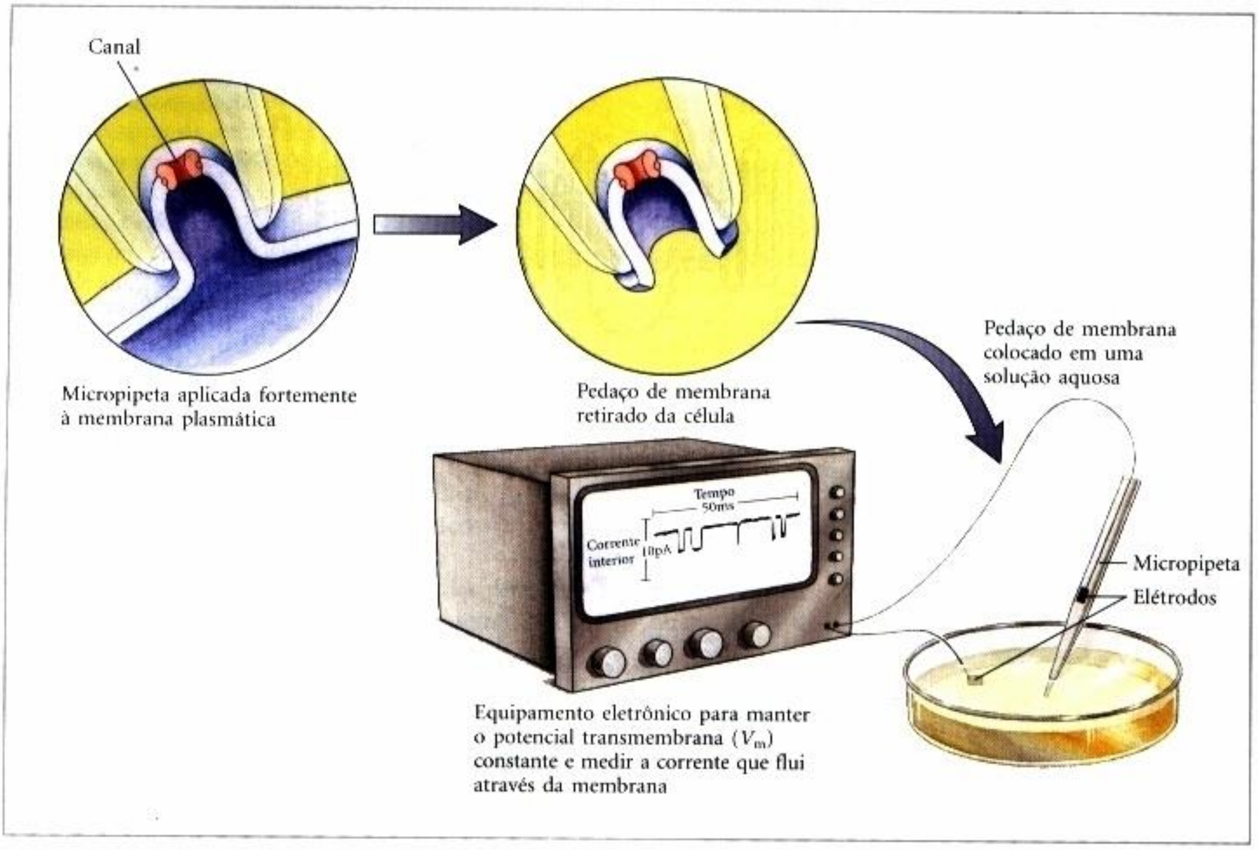
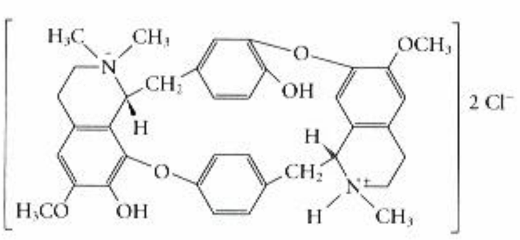

Canal
Micropipeta aplicada fortemente à membrana plasmática
Pedaço de membrana retirado da célula
Pedaço de membrana colocado em uma solução aquosa
Tempo
50ms
Corrente interior
10pA
Micropipeta
Elétrodos
Equipamento eletrônico para manter o potencial transmembrana (V_m) constante e medir a corrente que flui através da membrana

Figura 12-41 – Medidas elétricas da função canal iônico. A "atividade" de um canal iônico é estimada pela medida do fluxo de íons através dele, usando a técnica de pinçamento da membrana. Uma micropipeta é pressionada contra uma superfície da célula, e a pressão negativa na pipeta é usada para formar um selo de pressão entre a pipeta e a membrana. Quando a pipeta é puxada da célula, ela arrasta consigo um minúsculo pedaço de membrana (que pode conter um ou uns poucos canais iônicos). Quando a pipeta e o pedaço de membrana ligado são colocados em uma solução aquosa, a atividade do canal pode ser medida como a corrente elétrica que flui entre os conteúdos da pipeta e da solução iônica. Na prática, um circuito é montado, o qual fixa o potencial transmembrana em um certo valor e mede a corrente que deve fluir para manter essa voltagem. Com detectores de corrente altamente sensíveis, os pesquisadores podem medir a corrente fluindo através de um único canal iônico, tipicamente uns poucos picoamperes. O traço mostrando a corrente como função do tempo (em milissegundos) revela quanto rápido o canal se abre e fecha, quanto freqüentemente ele se abre, e por quanto tempo ele permanece aberto. Mantendo a V_m em diferentes valores permite-se uma determinação do efeito do potencial de membrana nesses parâmetros da função do canal.

serpente mamba preta contém a **dendrotoxina**, que interfere nos canais de K^+ dependentes de voltagem. A **tubocurarina**, o componente ativo do curare (usado como veneno das flechas no Amazonas), e duas outras toxinas de venenos de serpentes, **cobrotoxina** e **bungarotoxina**, bloqueiam o receptor da acetilcolina ou previnem a abertura de seu canal iônico. Ao bloquear sinais dos nervos aos músculos, todas essas toxinas causam paralisia e possivelmente morte. Do lado positivo, a afinidade extremamente alta da bungarotoxina para o receptor da acetilcolina ($K_d = 10^{-15}$M) provou-se útil quando a toxina marcada radioativamente foi usada para quantificar o receptor durante sua purificação.


H₃C
CH₃
N
CH₂
H
O
OH
OCH₃
H
CH₂
N
H
CH₃
H₃CO
OH
O
2 Cl⁻

Cloreto de D-tubocurarina

As porinas são canais transmembrana para moléculas pequenas

Na membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas como a *E. coli*, canais protéicos, chamados de **porinas**, permitem a passagem de moléculas muito maiores do que os íons, mas por um mecanismo mais semelhante a um canal de entrada do que a um transportador. A porina FhuA (Fig. 12-18) funciona na *E. coli* para trazer ferro (na forma de quelato do ferricromo) a partir do meio extracelular através da membrana externa da parede para dentro do espaço periplasmático. (Nas bactérias gram-negativas, o periplasma é o material entre as membranas interna — plasmática — e externa). FhuA é composta de um grande domínio de 22 fitas de barril β de cerca de 560 resíduos e um domínio cortiça aminoterminal de 160 resíduos, que normalmente obstrui o barril e mantém o canal fechado (Fig. 12-42). Ligando o complexo ferricromo a um sítio específico na superfície externa da parede celular desencadeia-se uma alteração alostérica que move o ferricromo para dentro do barril e permite a interação da proteína FhuA com as proteínas da membrana interna e do periplasma. Essa interação move a cortiça para fora do barril e permite a passagem do ferricromo através do canal. Com o esvaziamento do sítio de ligação do ferricromo, as alterações são reversas e o canal se fecha.

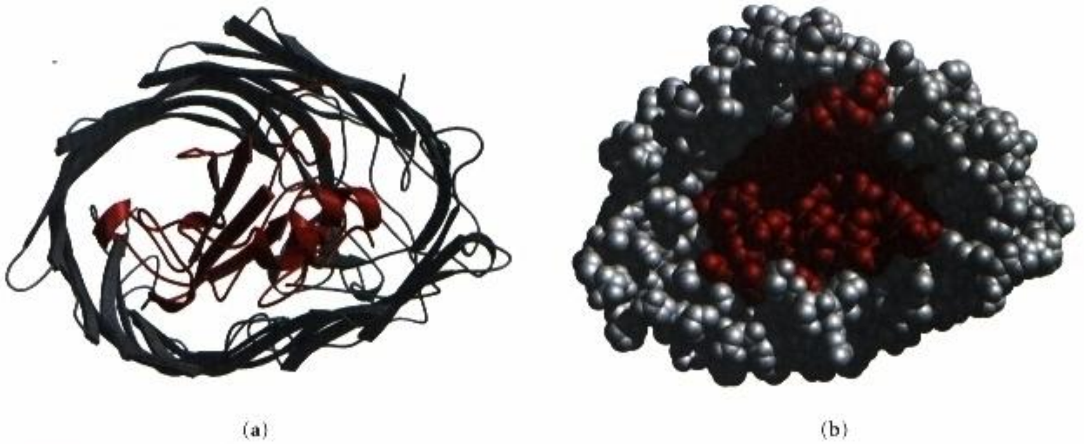


Figura 12-42 – Estrutura da FhuA, um transportador de ferro da *E. coli*. Essa proteína da membrana externa da parede da *E. coli* transporta ion ferro para dentro da célula na forma de um quelato ferricromo-ferro. A Figura 12-18 mostra uma representação em fita da proteína vista paralelamente à membrana. Aqui vemos (**a**) um modelo em fita e (**b**) um modelo espaço-cheio, vistos perpendicularmente à membrana. As 22 fitas do barril β (cinza) são vistas como uma pipa vazia, fechada em uma extremidade pelo domínio cortiça (vermelho). A ligação de uma molécula de ferricromo-ferro em um sitio específico na superfície externa da FhuA direciona uma mudança conformacional que ajuda a mover o tampão do canal; o ferricromo-ferro move-se então através do canal, e o transportador reassume a sua conformação fechada.

Os sistemas de transporte discutidos neste capítulo são resumidos na Figura 12-43.

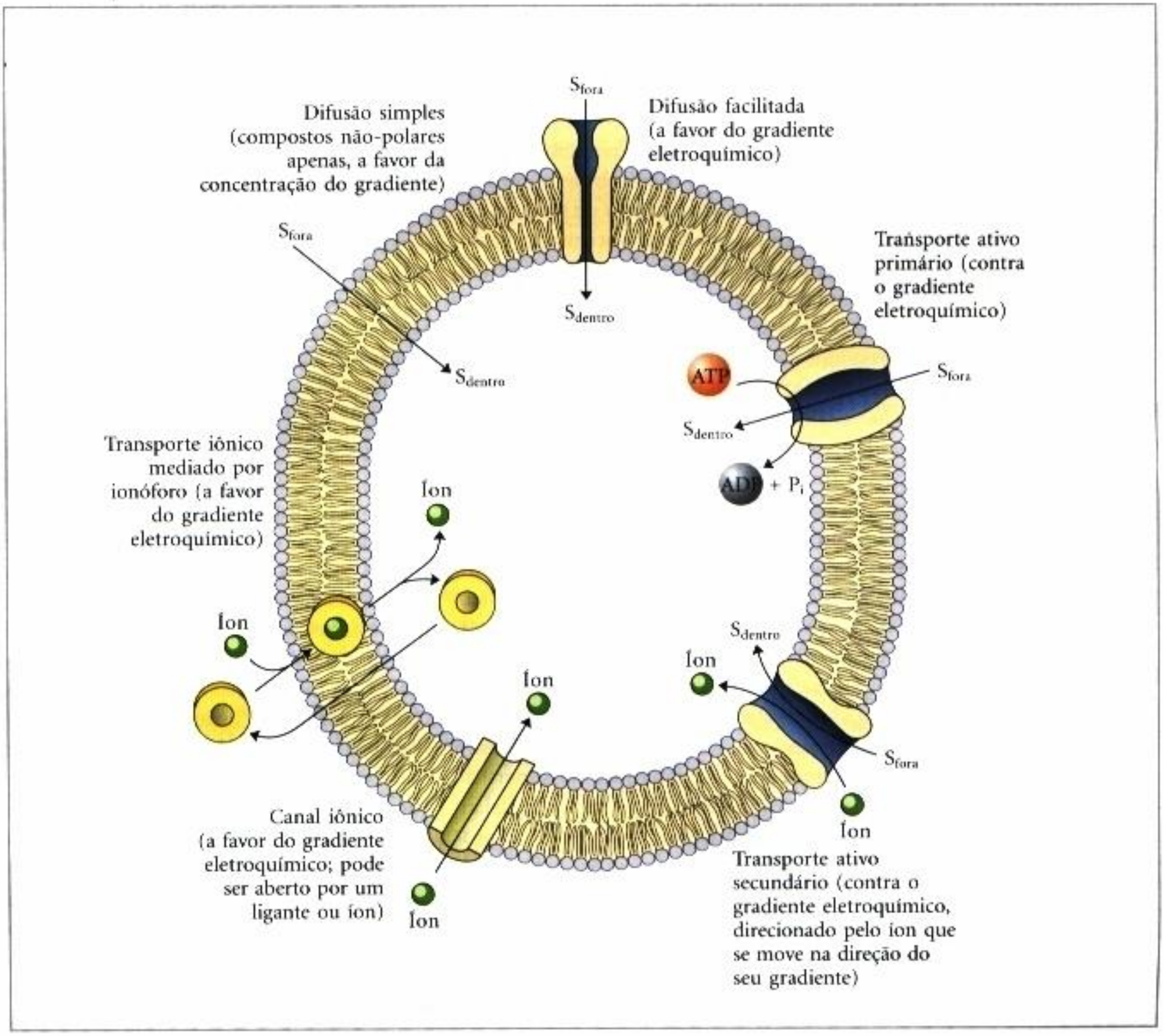

Difusão simples (compostos não-polares apenas, a favor da concentração do gradiente)
S_{fora}
S_{dentro}
S_{fora}
Difusão facilitada (a favor do gradiente eletroquímico)
S_{dentro}
Transporte ativo primário (contra o gradiente eletroquímico)
ATP
S_{fora}
S_{dentro}
ADP + P_i
Transporte iônico mediado por ionóforo (a favor do gradiente eletroquímico)
Íon
Íon
Íon
S_{dentro}
Íon
S_{fora}
Íon
Canal iônico (a favor do gradiente eletroquímico; pode ser aberto por um ligante ou íon)
Íon
Transporte ativo secundário (contra o gradiente eletroquímico, direcionado pelo íon que se move na direção do seu gradiente)

Figura 12-43 – Resumo dos tipos de transporte.

Resumo

As membranas biológicas são essenciais para a vida. Elas definem os limites celulares, dividem as células em compartimentos discretos, organizam seqüências de reações complexas e atuam na recepção de sinais e nas transformações de energia. As membranas são compostas de lipídios e proteínas, em combinações variáveis que são específicas para cada espécie, tipo celular e organela. O modelo do mosaico fluido descreve algumas características comuns a todas as membranas biológicas. A bicamada lipídica é a unidade estrutural básica. As cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios e o núcleo esteróide dos esteróis estão orientados para o interior da bicamada; suas interações hidrofóbicas estabilizam a bicamada, mas permitem que a estrutura seja flexível. Os lipídios e a maioria das proteínas são livres para se difundirem lateralmente dentro da membrana, e as porções hidrofóbicas dos lipídios sofrem uma rápida movimentação térmica, tornando o interior da bicamada fluido. A fluidez é afetada pela temperatura, composição de ácidos graxos e conteúdo em esterol. As células regulam suas composições em lipídios para manter uma fluidez constante quando as circunstâncias externas se alteram.

As proteínas periféricas da membrana estão frouxamente associadas com a membrana, por meio de interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio ou por âncoras lipídicas covalentemente ligadas. Proteínas integrais associam-se firmemente com as membranas por interações hidrofóbicas entre a bicamada lipídica e as cadeias laterais de seus aminoácidos não-polares, as quais estão orientadas para o exterior da molécula da proteína. Algumas proteínas de membrana atravessam a bicamada lipídica várias vezes, com seqüências hidrofóbicas de cerca de 20 resíduos de aminoácidos formando α-hélices transmembrana. Tais seqüências hidrofóbicas detectadas nas estruturas primárias das proteínas podem ser usadas para predizer a estrutura secundária e a disposição transmembrana dessas proteínas. Barris com múltiplas fitas β são também comuns nas proteínas integrais de membrana.

Os lipídios e as proteínas de membrana estão inseridos na bicamada com ladeamento específico; dessa forma, membranas são estrutural e funcionalmente assimétricas. Muitas proteínas de membrana contêm polissacarídeos de vários graus de complexidade ligados covalentemente. As glicoproteínas da membrana plasmática estão sempre orientadas com o domínio contendo o carboidrato na superfície extracelular. Uma variedade de proteínas medeiam a fusão de duas membranas, que acompanha processos como a endocitose e exocitose. A fusão requer íntima aposição de duas membranas e a ruptura local das bicamadas lipídicas, ambos os processos atribuídos a proteínas de fusão chamadas de SNAREs.

A bicamada lipídica é impermeável a substâncias polares. A água é uma exceção importante; ela é capaz de se difundir passivamente através da bicamada. As células que requerem grandes fluxos de água possuem canais específicos de água chamados de aquaporinas em suas membranas plasmáticas. Outras espécies polares cruzam as membranas biológicas apenas por meio de proteínas de membrana específicas — transportadores e canais iônicos.

Transportadores (proteínas de transporte), à semelhança das enzimas, apresentam saturação e especificidade de substrato. O transporte por meio desses sistemas pode ser passivo (na direção do gradiente eletroquímico e, portanto, independente da energia metabólica) ou ativo (contra o gradiente e, portanto, dependente da energia metabólica). O transporte de glicose para dentro dos eritrócitos e o transporte de água por meio das aquaporinas é passivo. O fornecimento de energia para o transporte ativo pode vir da luz, das reações de oxidação, da hidrólise do ATP ou do transporte duplo de algum outro soluto. Alguns transportadores desenvolvem o co-transporte, a passagem simultânea de duas espécies na mesma direção; outros medeiam o contratransporte, no qual duas espécies se movem em direções opostas, simultaneamente. O transportador da lactose da *E. coli* e o transportador da glicose nas células do epitélio intestinal são co-transportados, ambos co-transportando Na^+ juntamente com o açúcar. O trocador cloreto-bicarbonato dos eritrócitos e a ubíqua ATPase Na^+K^+ são contratransportadores. Nas células animais, as diferenças nas concentrações citosólicas e extracelulares do Na^+ e K^+ são estabelecidas e mantidas por transporte ativo por meio da ATPase Na^+K^+. O gradiente de Na^+ resultante por meio da membrana plasmática é usado como uma fonte de energia para uma variedade de processos ativos de transporte secundário, tanto co-transporte como contratransporte.

No transporte ativo primário, o ATP funciona diretamente como fonte de energia. Há quatro tipos gerais de transportadores ativos direcionados por ATP. As ATPases do tipo P sofrem fosforilação reversível durante seu ciclo catalítico e são inibidas pelo análogo do fosfato, o vanadato; os exemplos são as ATPases Na^+K^+ da membrana plasmática e os transportadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e endoplasmático (as bombas SERCA). As ATPases do tipo V produzem gradientes de prótons por meio das membranas de uma variedade de organelas intracelulares, incluindo a membrana vacuolar das plantas. As bombas de prótons do tipo F (ATP sintases) são centrais aos mecanismos conservadores de energia nas mitocôndrias e nos cloroplastos. Um transportador multidrogas nas células tumorais usa ATP para direcionar o transporte de uma variedade de drogas. Ionóforos são moléculas solúveis em lipídios que se ligam a íons específicos e os transportam passivamente através das membranas, dissipando a energia eletroquímica dos gradientes iônicos.

Canais iônicos fornecem poros hidrofílicos por meio dos quais íons específicos podem se difundir, movendo-se a favor de seus gradientes de concentração químicos e elétricos. Eles são caracteristicamente não saturáveis e possuem velocidades de fluxo muito altas. Muitos são altamente específicos para um íon, e a maioria é dependente quer de voltagem, quer de um ligante. A estrutura do canal de K⁺ é conhecida e funciona como protótipo para outros canais, como o canal iônico do receptor da acetilcolina e o canal de Na⁺ dependente de voltagem. Vários domínios α-helicoidais transmembrana agrupam-se em volta de um canal aquoso central. A passagem de íons é restrita por um filtro de seletividade e por uma entrada que obstrui o canal iônico quando ele não é ativado por voltagem ou por um ligante.

Porinas são proteínas integrais de membrana que consistem de barris β com uma abertura central transmembrana. Um domínio globular protéico impede a passagem do íon, mas a ligação de um substrato específico transitoriamente abre o poro central, permitindo a captação daquele substrato.

Leitura Adicional

Arquitetura da membrana

Devaux PF. (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**, 1163-1173.

Frye LD & Ediden M. (1970) The rapid intermixing of cell-surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J.Cell Sci.* 7, 319-335.

A demonstração clássica da mobilidade das proteínas de membrana.

Haltia T & Freire E. (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 295-322.

Excelente discussão sobre as estruturas secundária e terciárias das proteínas de membrana e os fatores de sua estabilização.

Jacobson K, Sheets ED, & Simon R. (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* **268**, 1441-1442.

Discussão da mobilidade restrita das proteínas de membrana, atualizando o modelo do trabalho de Singer e Nicolson (abaixo).

Singer SJ & Nicolson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.

A apresentação clássica do modelo.

von Heijne G. (1994) Membrane proteins: from sequence to structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 167-192.

Uma revisão das etapas requeridas na previsão da estrutura de uma proteína integral de membrana a partir da sua seqüência.

White SH & Wimley WC. (1999) Membrane protein folding and stability: Physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 319-365.

Fusão de membranas

Nichols BJ & Pelham HR. (1998) SNAREs and membrane fusion in the Golgi. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 9-31.

Transportadores

Lienhard FE, Slot JW, James DE, & Muecker MM. (1992) How cells absorb glucose. *Sci. Am.* **206** (January), 86-91.

Introdução ao transportador de glicose e sua regulação pela insulina.

Lingrel JB & Kuntzweller T. (1994) Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**, 19.659-19.662.

Møller JV, Juul B, & LeMaire M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transductions of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 1-51.

Mueckler M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**, 713-725.

Postle K. (1999) Active transport by customized β-barrels. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 3-6.

Descrição introdutória da estrutura das porinas de *E. coli* e do seu acoplamento com a energia metabólica.

Sheppard DN & Welsh MJ. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiolog. Rev.* **79**, S23-S46.

Esse número da revista possui 11 revisões do canal de cloreto CFTR, cobrindo sua estrutura, atividade, regulação, biossíntese e fisiopatologia.

Canais iônicos

Aidley DJ & Stanfield PR. (1996) *Ion Channels: Molecules in Action*. Cambridge University Press.

Capítulos excelentes sobre a estrutura molecular, abertura, interações de drogas dos canais iônicos, e doenças humanas que resultam de canais defeituosos.

Changeaux JP. (1993) Chemical signaling in the brain. *Sci. Am.* **269** (November), 58-62.

Estrutura e função do canal do receptor de acetilcolina.

Doyle DA, Cabral KM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, & MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.

A primeira estrutura cristalina de um canal iônico.

Edelstein SJ & Changeaux JP. (1998) Allosteric transitions of the acetylcholine receptor. *Adv. Prot. Chem.* **51**, 121-184.

Discussão avançada das alterações conformacionais induzidas pela acetilcolina.

Hille B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, Massuchusetts.

Enfatiza a função de canais iônicos; bom complemento ao Aidley e Stanfield (acima).

Marban E, Yamagishi T, & Tomaselli GF. (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* **508**, 647-657.

Revisão sobre a evolução, estrutura, abertura, interaçõs de drogas e síntese de canais de Na⁺ dependentes de voltagem.

Neher E & Sakmann B. (1992) The patch clamp technique. *Sci. Am.* (March) **266**, 44-51.

Descrição clara das técnicas eletrofisiológicas usadas para medir a atividade de um canal iônico isolado, pelo Prêmio Nobel que a desenvolveu.

Perozo E, Cortes DM, & Cuello LG. (1999) Structural rearrangements underlying K⁺ channel activation gating. *Science* **285**, 73-78.

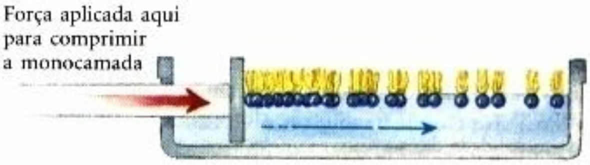
Estudos físicos dos mecanismos pelos quais os canais iônicos se abrem e fecham.

Unwin N. (1998) The nicotinic acetylcholine receptor of the *Torpedo* electric ray. *J. Struct. Biol.* **121**, 181-190.

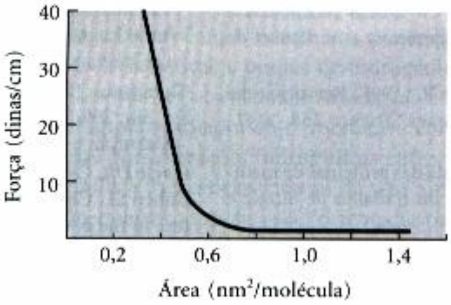
Evidência para a alteração estrutural que acompanha o fechamento do canal.

Problemas

1. Determinando a área da secção transversal de uma molécula de lipídio. Quando os fosfolípidios são mergulhados cuidadosamente na superfície da água, eles se orientam na interface água-ar com seus grupos cabeça na água e suas caudas hidrofóbicas no ar. Um aparelho experimental (**a**) foi desenvolvido para reduzir a área da superfície disponível para uma camada de lipídios. Medindo-se a força necessária para empurrar as moléculas de lipídios é possível determinar quando elas estão fortemente empacotadas em uma monocamada contínua; quando essa área for alcançada, a pressão necessária para reduzir ainda mais a área da superfície aumenta bruscamente (**b**). Como você usaria esse aparelho para determinar a área média ocupada por uma única molécula de lipídio na monocamada?



(**a**)



(**b**)

2. Evidência da bicamada lipídica. Em 1925, E. Gorter e F. Grendel usaram um aparelho semelhante àquele descrito no Problema 1, para determinar a área da superfície de uma monocamada formada por lipídios extraídos de eritrócitos de várias espécies animais. Eles usaram um microscópio para medir as dimensões das células individuais, a partir da qual calcularam a área da superfície média de um eritrócito. Obtiveram os dados apresentados na tabela a seguir. Justificava-se a conclusão desses investigadores de que "os cromócitos (eritrócitos) estão cobertos por uma camada de substâncias gordurosas que apresentam duas moléculas de espessura" (ou seja, uma bicamada lipídica)?

Animal	Volume das células empacotadas (mL)	Número de células (por mm^3)	Área da superfície total da monocamada de lipídios das células (m^2)	Área da superfície total de uma célula (μm^2)
Cachorro	40	8.000.000	62	98
Carneiro	10	9.900.000	6,0	29,8
Humano	1	4.740.000	0,92	99,4

Fonte: Dados de Gorter E & Grendel F. (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* **41**, 439-443.

3. Número de moléculas de detergente por micela. Quando uma pequena quantidade de dodecil sulfato de sódio ($Na^+CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-$) é dissolvida em água, os íons detergentes entram na solução como espécies monoméricas. À medida que mais detergente for adicionado, uma concentração é alcançada (a concentração micelar crítica), na qual os monômeros se associam para formar as micelas. A concentração micelar crítica do SDS é 8,2mM. As micelas possuem um peso de partícula médio (a soma dos pesos moleculares dos monômeros constituintes) de 18.000. Calcule o número de moléculas do detergente na micela média.

4. Propriedades dos lipídios e das bicamadas de lipídios. As bicamadas de lipídios formadas entre duas fases aquosas possuem esta propriedade importante: elas formam lençóis bidimensionais, as margens dos quais se fecham uns sobre os outros e sofrem auto-selamento para formar lipossomos.

(a) Quais propriedades dos lipídios são responsáveis por essa propriedade das bicamadas? Explique.

(b) Quais são as conseqüências dessa propriedade com respeito à estrutura das membranas biológicas?

5. O comprimento de uma molécula de ácido graxo. A distância da ligação carbono-carbono para as ligações simples, como aquelas encontradas em uma cadeia de ácido graxo saturada, é cerca de 1,5Å. Estime o comprimento de uma única molécula do palmitato em sua forma totalmente estendida. Se duas moléculas de palmitato forem colocadas com cada extremidade tocando a outra, como sua extensão total se compararia com a espessura da bicamada de lipídio em uma membrana biológica?

6. Dependência da temperatura para a difusão lateral. O experimento descrito na Figura 12-7 foi realizado a 37°C. Se fosse realizado a 10°C, que efeito você prediziria na velocidade da fusão célula-célula e na velocidade da mistura das proteínas da membrana? Por quê?

7. Síntese do suco gástrico: energética. O suco gástrico (pH 1,5) é produzido bombeando-se HCl do plasma sangüíneo (pH 7,4) para o estômago. Calcule a quantidade de energia livre requerida para concentrar o H^+ em 1 litro de suco gástrico a 37°C. Nas condições celulares, quantos moles de ATP devem ser hidrolisados para fornecer essa quantidade de energia livre? A variação de energia livre para a hidrólise do ATP nas condições celulares é cerca de –58kJ/mol (como explicaremos no Capítulo 14).

8. Energética da ATPase Na^+K^+. A concentração de Na^+ dentro de uma célula de vertebrados é cerca de 12mM e aquela no plasma sangüíneo é cerca de 145mM. Para uma célula típica, com um potencial transmembrana de –0,07V (interior negativo em relação ao exterior), qual é a variação de energia livre necessária para transportar 1 mol de Na^+ para fora da célula e para dentro da corrente sangüínea a 37°C?

9. Ação da ouabaína no tecido renal. A ouabaína inibe especificamente a atividade da ATPase Na^+K^+ dos tecidos animais, mas parece não inibir nenhuma outra enzima. Quando a ouabaína é adicionada em fatias finas de tecido renal vivo, ela inibe o consumo de oxigênio em 66%. Por quê? O que essa observação nos mostra sobre o uso da energia respiratória pelo tecido renal?

10. Energética do co-transporte. Suponha que você determinou experimentalmente que um sistema de transporte celular para a glicose, direcionado pelo co-transporte de Na^+, poderia acumular glicose em concentrações 25 vezes maiores que aquela do meio externo, enquanto a $[Na^+]$ externa era apenas 10 vezes maior que a $[Na^+]$ intracelular. Isso violaria as leis da termodinâmica? Se não, como você explicaria essa observação?

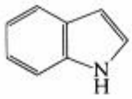
11. Localização de uma proteína de membrana. As seguintes observações são feitas sobre uma proteína de membrana desconhecida, X. Ela pode ser extraída de membranas de eritrócito rompidas em uma solução salina concentrada, e X, isolada, pode ser clivada em fragmentos por enzimas proteolíticas. O tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas, seguido pela ruptura e extração dos componentes de membrana, produz X intata. Entretanto, o tratamento dos "fantasmas" do eritrócito (que consistem apenas de membranas obtidas pela ruptura das células e lavagem da hemoglobina) com enzimas proteolíticas, seguida da ruptura e extração, produz X grandemente fragmentada. O que esses experimentos indicam sobre a localização de X na membrana plasmática? As propriedades de X se assemelham àquelas de uma proteína de membrana integral ou periférica?

12. Membrana auto-selante. As membranas celulares são auto-selantes — se forem furadas ou rompidas mecanicamente, elas rápida e automaticamente se resselam. Que propriedades da membrana são responsáveis por essa importante característica?

13. Temperaturas de fusão dos lipídios. Lipídios de membrana obtidos em amostras de tecidos de diferentes partes da perna de uma rena possuem composições diferentes de ácidos graxos. Os lipídios de membrana dos tecidos próximos às patas contêm uma proporção maior de ácidos graxos insaturados que os lipídios dos tecidos da parte superior da perna. Qual é o significado dessa observação?

14. Difusão transversa. A face interna (monocamada) da membrana do eritrócito humano consiste predominantemente de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. A face externa consiste predominantemente de fosfatidilcolina e esfingomielina. Embora os componentes fosfolipídios da membrana possam se difundir na bicamada fluida, essa distribuição é preservada sempre. Como?

15. Permeabilidade da membrana. Em pH 7,0, o triptofano atravessa uma bicamada lipídica da membrana cerca de 1.000 vezes mais lentamente que o indol, substância muito semelhante:



Sugira uma explicação para essa observação.

16. Fluxo de água através de uma aquaporina. Cada eritrócito humano possui cerca de 2×10^6 AQP-1 monômeros. Se a água flui através da membrana plasmática em uma velocidade de 5×10^8 moléculas de água por tetrâmero de AQP-1 por segundo, e o volume de um eritrócito é 5×10^{-11} mL, quanto rapidamente um eritrócito poderia dividir pela metade o seu volume quando encontrar a alta osmolaridade (1M) do fluido intersticial da medula renal?

17. Marcando o transportador de galactosídeo. O transportador de galactosídeo de uma bactéria, que é altamente específica para o seu substrato lactose, contém um resíduo de Cys, essencial para a sua atividade de transporte. A reação covalente da *N*-etilmaleimida (NEM) com esse resíduo de Cys irreversivelmente inativa o transportador. Uma alta concentração de lactose no meio previne a inativação pelo NEM, presumivelmente protegendo estericamente o resíduo de Cys, que está no sítio de ligação da lactose ou próximo a ele. Você não sabe nada mais sobre a proteína transportadora. Sugira um experimento que poderia permitir a determinação do M_r do polipeptídeo transportador contendo Cys.

18. Prediga a topologia da proteína de membrana a partir da seqüência. Você clonou o gene para uma proteína do eritrócito humano, que se suspeita ser uma proteína de membrana. A partir da seqüência de nucleotídeos do gene, você conhece a seqüência de aminoácidos. A partir dessa seqüência sozinha, como avaliaria a possibilidade de a proteína ser uma proteína integral? Suponha que a proteína proveja ser uma proteína integral do tipo I ou do tipo II. Sugira experimentos bioquímicos e químicos que possam permitir determinar que tipo ela é.

19. Captação da leucina intestinal. Você está estudando a captação da L-leucina pelas células epiteliais do intestino do camundongo. Medidas da velocidade de captação da L-leucina e vários de seus análogos, com ou sem Na^+ no tampão de ensaio, produzem os resultados apresentados na tabela a seguir. O que você concluiria sobre as propriedades e os mecanismos do transportador da leucina? Você esperaria que a captação da L-leucina fosse inibida pela ouabaína?

	Captação na presença de Na^+		Captação na ausência de Na^+	
Substrato	$V_{máx}$	K_t (mM)	$V_{máx}$	K_t (mM)
L-Leucina	420	0,24	23	0,24
D-Leucina	310	4,7	5	4,7
L-Valina	225	0,31	19	0,31

20. Efeito de um ionóforo sobre o transporte ativo. Considere o transportador de leucina descrito no Problema 19. Seria a $V_{máx}$ ou a K_t alterada se você adicionasse um ionóforo de Na^+ à solução do ensaio contendo Na^+? Explique.

21. Densidade de superfície de uma proteína de membrana. A *E. coli* pode ser induzida a sintetizar cerca de 10.000 cópias do transportador de galactosídeo (M_r 31.000) por célula. Assuma que a *E. coli* seja um cilindro de 1μm de diâmetro e 2μm de comprimento. Que fração da superfície da membrana plasmática é ocupada pelas moléculas transportadoras do galactosídeo? Explique como você chegou a essa conclusão.

Bioquímica na internet

22. Topologia da proteína de membrana. O receptor para o hormônio adrenalina nas células animais é uma proteína integral de membrana (M_r 64.000) que se acredita possuir sete regiões atravessadoras da membrana.

(a) Mostre que uma proteína desse tamanho é capaz de atravessar a membrana sete vezes.

(b) Considerando a seqüência de aminoácidos dessa proteína, você prediziria que regiões da proteína formariam as hélices atravessadoras da membrana?

(c) Vá até a página do banco de dados de proteínas da Web (Protein Data Bank). Use o identificador PDB IDEP para salvar os dados da página para uma porção do receptor β-adrenérgico (um tipo do receptor de adrenalina) do peru. Usando Chime para explorar a estrutura, prediga onde essa porção do receptor está localizada: dentro ou na superfície da membrana. Explique.

(d) Salve os dados para uma porção de um outro receptor, o receptor da acetilcolina dos neurônios e miócitos, usando o identificador PDB 1A11. Como em (c), prediga onde essa porção do receptor está localizada e explique sua resposta.

Se você ainda não usou o PDB ou Chemscape Chime, você poderá encontrar instruções em http://www.worthpublishers.com/lehninger.

CAPÍTULO 13

Biossinalização

A habilidade das células de receber e reagir a sinais vindos do outro lado da membrana plasmática é fundamental para a vida. As células bacterianas recebem informações constantes dos seus receptores de membrana que sensoriam o meio circundante para o pH; a pressão osmótica; a disponibilidade de alimentos, oxigênio e luz; e a presença de químicos nocivos, de predadores ou de competidores para o alimento. Esses sinais induzem respostas apropriadas, tais como a movimentação em direção ao alimento ou o afastamento de substâncias tóxicas ou ainda a formação de esporos dormentes em um meio desprovido de nutrientes. Em organismos multicelulares, células com funções diferentes trocam uma variedade de sinais. As células das plantas respondem a hormônios de crescimento e a variações da luz solar. As células animais trocam informações sobre o seu posicionamento correto em um embrião em desenvolvimento, a concentração de íons e glicose nos fluidos extracelulares e as atividades metabólicas interdependentes que ocorrem em tecidos diferentes. Os sinais nos animais podem ser autócrinos (agindo na mesma célula que o produz), parácrinos (agindo em um vizinho próximo) ou endócrinos (transportados na corrente sangüínea da célula produtora até uma célula-alvo distante). Em todos os três casos, o sinal é detectado por um receptor específico e convertido em uma resposta celular.

Embora o número de sinais biológicos seja enorme (Tabela 13-1), como o é a variedade de respostas biológicas a esses sinais, os organismos usam apenas alguns poucos mecanismos evolucionários para detectar sinais extracelulares e *transformá-los* em alterações intracelulares. Neste capítulo examinaremos alguns exemplos das principais classes de mecanismos de sinalização e veremos como eles são integrados em funções biológicas específicas como a transmissão de sinais nervosos, a resposta a hormônios e a fatores de crescimento, o sensoriamento da visão, do cheiro e do sabor, e o controle do ciclo celular. Freqüentemente, o resultado final de uma via de sinalização é a fosforilação de algumas poucas proteínas celulares alvos específicas, que alteram suas atividades e, em conseqüência, as atividades da célula. Ao longo de nossa discussão, enfatizaremos a conservação dos mecanismos fundamentais para a transdução dos sinais biológicos e a adaptação desses processos básicos ligados à membrana, a uma grande variedade de vias de sinalização.

Tabela 13-1 – Alguns sinais aos quais as células respondem

- Antígenos
- Glicoproteínas/oligossacarídeos da superfície celular
- Sinais do desenvolvimento
- Componentes da matriz extracelular
- Fatores de crescimento
- Hormônios
- Luz
- Toque mecânico
- Neurotransmissores
- Odorantes
- Feromônios
- Gustativos

Mecanismos Moleculares da Transdução de Sinal

As transduções de sinais são extraordinariamente específicas e delicadamente sensíveis. A **especificidade** é conseguida pela complementaridade molecular precisa entre o sinal e as moléculas receptoras (Fig. 13-1a), mediada pelas mesmas espécies de forças fracas (não-covalentes) que ocorrem nas interações enzima-substrato e antígeno-anticorpo. Nos organismos multicelulares, a especificidade é mais desenvolvida porque receptores para um dado sinal ou os alvos intracelulares de uma dada via de sinalização estão presentes apenas em certos tipos celulares. O hormônio liberador da tireotrofina, por exemplo, desencadeia respostas nas células da hipófise anterior mas não nos hepatócitos, os quais não possuem receptores para esse hormônio. A adrenalina altera o metabolismo do glicogênio nos hepatócitos mas não nos eritrócitos, embora, nesse caso, ambos os tipos celulares possuam receptores para o hormônio; entretanto, os hepatócitos possuem a enzima metabolizadora do glicogênio, a qual é estimulada pela adrenalina, e os eritrócitos não.

Três fatores são responsáveis pela extraordinária sensibilidade da transdução do sinal: a alta afinidade dos receptores para as moléculas do sinal, a cooperatividade na interação ligante-receptor e a amplificação do sinal pelas cascatas de enzimas. A afinidade entre o sinal (ligante) e o receptor pode ser expressa como a constante de dissociação K_d, freqüentemente 10^{-10}M ou menor, significando que o receptor pode detectar concentrações picomolares de uma molécula sinal. As interações receptor-ligante podem ser quantificadas pela análise de Scatchard, que, nos melhores casos, produz uma medida quantitativa da afinidade (K_d) e o número de sítios de ligação do ligante em uma amostra do receptor (Adendo 13-1). A cooperatividade nas interações receptor-ligante leva a grandes alterações na ativação do receptor, com pequenas alterações na concentração do ligante (relembre o efeito da cooperatividade na ligação do oxigênio com a hemoglobina; veja Fig. 7-12). A **amplificação** pelas **cascatas de enzimas** ocorre quando uma enzima associada com um sinal receptor é ativada e, por sua vez, catalisa a ativação de muitas moléculas de uma segunda enzima, cada uma das quais ativa muitas moléculas de uma terceira enzima, e assim por diante (Fig. 13-1b). Amplificações de várias ordens de grandeza são produzidas em milissegundos por tais cascatas.

A sensibilidade dos sistemas de receptores está sujeita à modificação. Quando um sinal está presente continuamente, ocorre uma **dessensibilização** do sistema do receptor (Fig. 13-1c); quando o estímulo cai abaixo de um certo limiar, o sistema

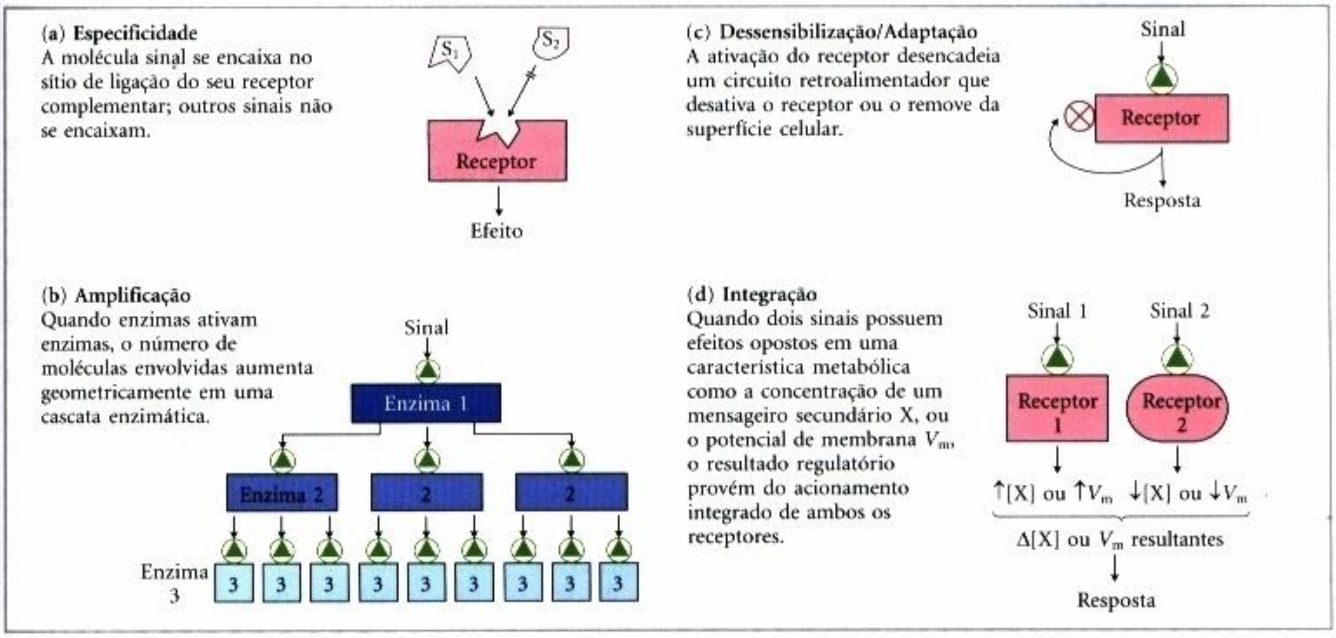

(a) Especificidade
A molécula sinal se encaixa no sítio de ligação do seu receptor complementar; outros sinais não se encaixam.
S1
S2
Receptor
Efeito
(b) Amplificação
Quando enzimas ativam enzimas, o número de moléculas envolvidas aumenta geometricamente em uma cascata enzimática.
Sinal
Enzima 1
Enzima 2
2
2
Enzima 3
3
(c) Dessensibilização/Adaptação
A ativação do receptor desencadeia um circuito retroalimentador que desativa o receptor ou o remove da superfície celular.
Sinal
Receptor
Resposta
(d) Integração
Quando dois sinais possuem efeitos opostos em uma característica metabólica como a concentração de um mensageiro secundário X, ou o potencial de membrana V_m, o resultado regulatório provém do acionamento integrado de ambos os receptores.
Sinal 1
Sinal 2
Receptor 1
Receptor 2
↑[X] ou ↑V_m
↓[X] ou ↓V_m
Δ[X] ou V_m resultantes
Resposta

Figura 13-1 – Quatro características dos sistemas de transdução de sinais.

novamente se torna sensível. Pense no que acontece a seu sistema de transdução visual quando você caminha da luz solar brilhante para um quarto escuro ou vice-versa.

Uma característica final marcante dos sistema de transdução de sinal é a **integração** (Fig. 13-1d), a habilidade do sistema de receber sinais múltiplos e produzir uma resposta unificada apropriada às necessidades da célula ou do organismo. Diferentes vias de sinalização "conversam" umas com as outras, em vários níveis, gerando uma riqueza de interações que mantém a homeostase na célula e no organismo.

Consideraremos os detalhes moleculares de vários sistemas representativos da transdução de sinal. O gatilho para cada sistema é diferente, mas as etapas da transdução do sinal são comuns a todos: um sinal interage com um receptor; o receptor ativado interage com a maquinaria celular produzindo um segundo sinal ou uma mudança na atividade de uma proteína celular; a atividade metabólica da célula-alvo sofre uma alteração; e finalmente o evento da transdução é terminado e a célula retorna ao seu estado pré-estímulo. Para ilustrar essas características gerais dos sistemas de sinalização fornecemos exemplos de cada um dos quatro mecanismos básicos de sinalização (Fig. 13-2).

Os mais simples transdutores de sinais são os canais iônicos da membrana plasmática, os quais se abrem e fecham em resposta à ligação de ligantes químicos ou a alterações no potencial transmembrana. O receptor-canal iônico da acetilcolina é um exemplo desse mecanismo. O segundo mecanismo básico de sinalização envolve receptores da membrana plasmática que são enzimas (receptores enzimáticos). Quando um desses receptores é ativado pelo seu ligante extracelular, ele catalisa a produção de um segundo mensageiro intracelular. Esse mecanismo é exemplificado pelo receptor da insulina. O terceiro mecanismo de transdução, ilustrado pelo sistema do receptor β-adrenérgico que detecta a adrenalina (epinefrina), é mediado por proteínas receptoras da membrana plasmática que *indiretamente* ativam enzimas (por meio de proteínas de ligação ao GTP) que produzem mensageiros secundários intracelulares. Finalmente, o núcleo possui uma grande classe de receptores que, quando ligados ao seu ligante específico (como o hormônio esteróide estrógeno), alteram a freqüência com que genes específicos são transcritos e traduzidos em proteínas celulares. Pelo fato de os hormônios esteróides funcionarem por meio de mecanismos intimamente relacionados à regulação da expressão gênica, considerá-lo-emos aqui apenas resumidamente e adiaremos uma discussão detalhada da sua ação para o Capítulo 28.

Antes de continuarmos nossa discussão sobre os canais iônicos, precisamos considerar alguma informação básica sobre canais iônicos e potenciais de membrana.

Canais Iônicos

Os canais iônicos estão sujeitos à sinalização elétrica nas células excitáveis

A excitabilidade de células sensoriais, neurônios e miócitos depende dos canais iônicos, transdutores de sinais que fornecem uma via regulada para a movimentação de íons inorgânicos, tais como o Na^+, K^+, Ca^{2+} e Cl^-, através da membrana plasmática, em resposta a vários estímulos. Lembre-se de que esses canais iônicos são "reguláveis" (Capítulo 12); eles podem ser abertos ou fechados, dependendo se o receptor associado foi ativado pela ligação com seu ligante específico (um neurotransmissor, por exemplo) ou por uma mudança no potencial elétrico transmembrana, V_m. A ATPase Na^+K^+ cria um desequilíbrio através da membrana plasmática transportando 3 Na^+ para fora da célula para cada 2 K^+ transportados para dentro (Fig. 13-3a), tornando o interior negativo em relação ao exterior. Diz-se que a membrana está agora polarizada. Por convenção, V_m é negativo quando o interior das células está negativo em relação ao exterior. Para uma célula animal típica, $V_m = -60$ a -70mV.

Pelo fato de os canais iônicos geralmente permitirem a passagem tanto de ânions quanto de cátions, mas não de ambos, o fluxo de íons através de um canal produz uma redistribuição de carga nos dois lados da membrana, alterando o V_m. O influxo de uma carga positiva, como o Na^+, ou o efluxo de uma carga negativa, como o Cl^-, despolariza a membrana e leva o V_m próximo a zero. Contrariamente, o efluxo do íon positivo K^+ hiperpolariza a membrana, e o V_m torna-se mais negativo. Esses fluxos iônicos através dos canais são passivos, diferentemente do transporte ativo da ATPase Na^+K^+.

Adendo 13-1 A análise de Scatchard quantifica a interação receptor-ligante

As ações celulares de um hormônio começam quando o hormônio (ligante), L, liga-se específica e fortemente à sua proteína receptora R, na célula-alvo. A ligação é mediada por interações não-covalentes (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas) entre as superfícies complementares do ligante e do receptor. A interação receptor-ligante leva a uma mudança conformacional que altera a atividade biológica do receptor, que pode ser uma enzima, um regulador enzimático, um canal iônico ou um regulador da expressão gênica.

A ligação receptor-ligante é descrita pela equação

$$\underset{\text{Receptor}}{R} + \underset{\text{Ligante}}{L} \rightleftharpoons \underset{\text{Complexo receptor-ligante}}{RL}$$

Esta ligação, à semelhança da de uma enzima ao seu substrato, é dependente da concentração dos seus componentes interactantes e pode ser descrita por uma constante de equilíbrio:

$$R + L \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} RL$$

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = 1/K_d$$

onde K_a é a constante de associação e K_d a constante de dissociação.

Como no caso da ligação enzima-substrato, a ligação receptor-ligante é saturável. À medida que mais ligante é adicionado a uma quantidade fixa de receptor, uma fração crescente das moléculas do receptor é ocupada pelo ligante (Fig. 1a). Uma medida grosseira da afinidade receptor-ligante é dada pela concentração do ligante necessária para se obter a meia-saturação do receptor. A **análise de Scatchard** da ligação receptor-ligante permite uma estimativa tanto da constante de dissociação K_d como do número de sítios de ligação do receptor numa dada preparação. Quando a ligação atinge o equilíbrio, o número total de possíveis sítios de ligação, $B_{máx}$, é igual ao número de sítios não ocupados, representado por [R], mais o número de sítios ocupados ou ligados ao ligante, [RL], ou seja, $B_{máx} = [R] + [RL]$. O número de sítios não ligados pode ser expresso pelo total de sítios menos os sítios ocupados: $[R] = B_{máx} - [RL]$. A expressão do equilíbrio pode ser agora escrita

$$K_a = \frac{[RL]}{[L](B_{máx} - [RL])}$$

Rearranjando para se obter o quociente entre o ligante ligado ao receptor e o ligante livre (não ligado), obtemos

$$\frac{[\text{Ligado}]}{[\text{Livre}]} = \frac{[RL]}{[L]} = K_a(B_{máx} - [RL])$$
$$= \frac{1}{K_d}(B_{máx} - [RL])$$

Esta forma de equação, inclinação-intercepto, mostra que uma representação de [ligante ligado]/[ligante livre] *versus* [ligante ligado] deveria fornecer uma linha reta com uma inclinação de $-K_a$ (ou $-1/K_d$) e um intercepto na abscissa de $B_{máx}$, o número total de sítios de ligação (Fig. 1b). A análise de Scatchard de várias interações hormônio-ligante de diferentes forneceu valores K_d de cerca de 10^{-9} a 10^{-11}M, correspondendo a ligações muito fortes do ligante pelo receptor.

A análise de Scatchard é segura para os casos mais simples, mas da mesma forma que a representação Linewever-Burk para as enzimas, quando o receptor for uma enzima alostérica, a representação mostrará desvios da linearidade.

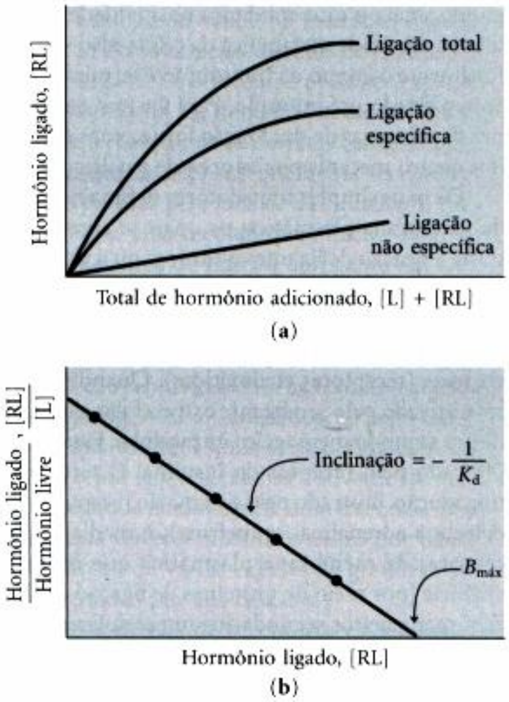


Figura 1 – A análise de Scatchard da interação receptor-ligante. Um ligante radioativamente marcado (L) — por exemplo, um hormônio — é adicionado em várias concentrações a uma quantidade fixa do receptor (R), e a fração do hormônio ligada ao receptor é determinada separando o complexo receptor-hormônio (RL) do hormônio livre. (**a**) Um diagrama da [RL] *versus* a quantidade total do hormônio, [L] + [RL], é uma hipérbole, elevando-se em direção a um máximo para [RL] à medida que os sítios receptores se tornem saturados. Para controlar os sítios de ligação inespecíficos, não saturáveis (os hormônios eicosanóides se ligam não especificamente à bicamada de lipídios, por exemplo), numa série separada de experimentos de ligação, um grande excesso de hormônios não marcados é adicionado junto com uma solução diluída do hormônio marcado. As moléculas não marcadas competem com as moléculas marcadas para os sítios de ligação específicos do sítio saturável no receptor, mas não para a ligação não específica. O valor real da ligação específica é obtido pela subtração das ligações não específicas das ligações totais. (**b**) Um diagrama linear da [RL]/[L] *versus* [RL] oferece o K_d e o $B_{máx}$ para o complexo receptor-hormônio. Compare estes diagramas com aqueles da V_0 *versus* [S] (veja Fig. 8-12) e $1/V_0$ *versus* 1/[S] para o complexo enzima-substrato (veja Adendo 8-1).

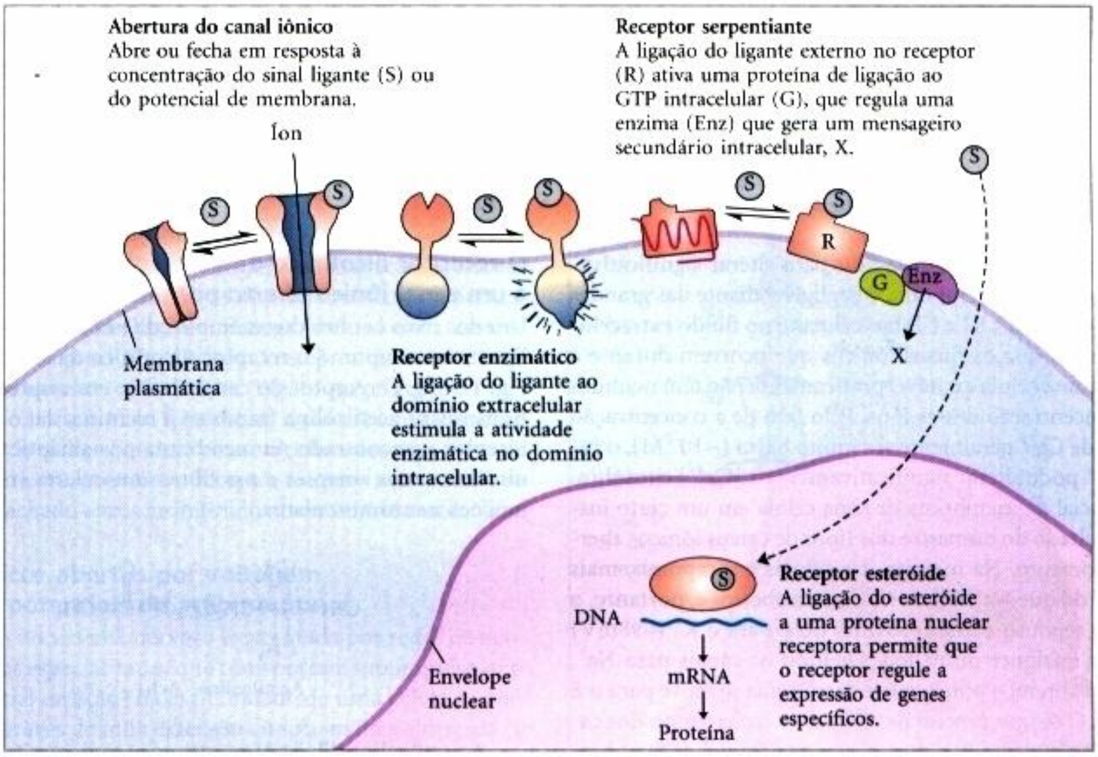

Abertura do canal iônico
Abre ou fecha em resposta à concentração do sinal ligante (S) ou do potencial de membrana.
Íon
S
Membrana plasmática
Receptor enzimático
A ligação do ligante ao domínio extracelular estimula a atividade enzimática no domínio intracelular.
Receptor serpentiante
A ligação do ligante externo no receptor (R) ativa uma proteína de ligação ao GTP intracelular (G), que regula uma enzima (Enz) que gera um mensageiro secundário intracelular, X.
R
G
Enz
X
Receptor esteróide
A ligação do esteróide a uma proteína nuclear receptora permite que o receptor regule a expressão de genes específicos.
DNA
mRNA
Proteína
Envelope nuclear

Figura 13-2 – Quatro tipos gerais de transdutores de sinais.

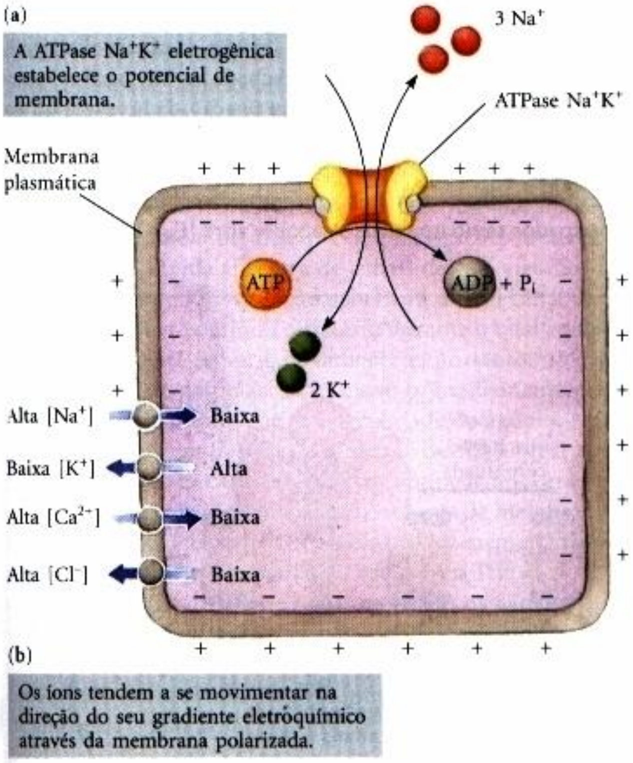

(a)
A ATPase Na⁺K⁺ eletrogênica estabelece o potencial de membrana.
3 Na⁺
ATPase Na⁺K⁺
Membrana plasmática
ATP
ADP + Pᵢ
2 K⁺
Alta [Na⁺]
Baixa
Baixa [K⁺]
Alta
Alta [Ca²⁺]
Baixa
Alta [Cl⁻]
Baixa
(b)
Os íons tendem a se movimentar na direção do seu gradiente eletroquímico através da membrana polarizada.

Figura 13-3 – Potencial elétrico transmembrana. (**a**) A ATPase Na^+K^+ eletrogênica produz um potencial elétrico transmembrana de –60mV (negativo internamente). (**b**) As setas azuis mostram a direção em que os íons tendem a se mover espontaneamente através da membrana plasmática em uma célula animal, direcionados pela combinação dos gradientes químicos e elétricos. O gradiente químico direciona o Na^+ e o Ca^{2+} para dentro (produzindo a despolarização) e o K^+ para fora (produzindo a hiperpolarização). O gradiente elétrico direciona o Cl^- para fora, contra seu gradiente de concentração (produzindo a despolarização).

A direção de um fluxo iônico espontâneo através de uma membrana polarizada é ditada pelo potencial eletroquímico dos íons através da membrana. A força (ΔG) que faz um certo íon passar espontaneamente através de um canal iônico é uma função do quociente das suas concentrações nos dois lados da membrana (C_2/C_1) e da diferença no potencial elétrico ($\Delta\psi$ ou V_m):

$$\Delta G = RT \ln (C_{fora}/C_{dentro}) + Z\mathcal{F}\, V_m \qquad (13\text{-}1)$$

onde R é a constante de gases, T a temperatura absoluta, Z a carga do íons e $\mathcal{F}$ a constante de Faraday. Em um neurônio ou miócito típico, as concentrações de Na^+, K^+, Ca^{2+} e Cl^- no citosol são muito diferentes das no fluido extracelular (Tabela 13-2). Diante dessas diferenças de concentração, o V_m de repouso de –60mV e as relações mostradas na Equação 13-1, a abertura de um canal de Na^+ ou Ca^{2+} levará a um fluxo espontâneo do Na^+ ou Ca^{2+} para dentro (e despolarização), enquanto a abertura de um canal de K^+ levará a um fluxo espontâneo do K^+ para fora (e hiperpolarização) (Fig. 13-3b).

Uma dada espécie iônica continua a fluir através de um canal apenas enquanto a combinação do gradiente de concentração e do potencial elétrico fornecer uma força diretiva, de acordo com a Equação 13-1. Por exemplo, à medida que o Na^+ flui na direção do seu gradiente de concentração, ele despolariza a membrana. Quando o potencial da membrana atinge +70mV, o efeito desse potencial de membrana (de resistir às entradas adicionais de Na^+) iguala o efeito do gradiente de concentração do Na^+ (de induzir que mais Na^+ entre para dentro). Nesse ponto de equilíbrio (E), a força diretiva tendente a mover um íon (ΔG) é zero, e a Equação 13-1 pode ser rearranjada levando à equação de Nernst:

$$E = -(RT/Z\mathcal{F}) \ln (C_{fora}/C_{dentro})$$

O potencial de equilíbrio é diferente para cada espécie iônica porque o gradiente de concentração difere para cada íon.

Tabela 13-2 – Concentrações iônicas nas células e fluidos extracelulares (mM)

	K^+		Na^+		Ca^{2+}		Cl^-	
	dentro	**fora**	**dentro**	**fora**	**dentro**	**fora**	**dentro**	**fora**
Tipo celular								
Axônio da lula	400	20	50	440	$\leq 0{,}4$	10	40-150	560
Músculo do sapo	124	2,3	10,4	109	$<0{,}1$	2,1	1,5	78

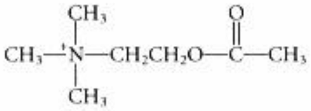
O número de íons que deve fluir para alterar significativamente o potencial de membrana é negligível diante das grandes concentrações de Na^+, K^+ e Cl^- nas células e no fluido extracelular, de tal forma que os fluxos iônicos que ocorrem durante a sinalização numa célula excitável praticamente não têm nenhum efeito na concentração desses íons. Pelo fato de a concentração intracelular de Ca^{2+} geralmente ser muito baixa ($\sim 10^{-7}$M), o influxo de Ca^{2+} pode alterar significativamente a $[Ca^{2+}]$ citosólica.

O potencial de membrana de uma célula em um certo instante é o resultado do número e dos tipos de canais iônicos abertos nesse momento. Na maioria das células em repouso, mais canais de K^- do que Na^+, Cl^- ou Ca^{2+} estão abertos e, portanto, o potencial de repouso é mais próximo do *E* para o K^+ (–98mV) do que para qualquer outro íon. Quando os canais para Na^+, Ca^+ ou Cl^- se abrem, o potencial de membrana se move para o *E* daquele íon. O tempo preciso de abertura e fechamento dos canais iônicos e as resultantes alterações no potencial de membrana são a base da sinalização elétrica pelas quais o sistema nervoso sinaliza o músculo esquelético a contrair, o coração a bater ou as células secretórias a liberar os seus conteúdos. Além disso, muitos hormônios exercem seus efeitos alterando os potenciais de membrana das células-alvo. Esses mecanismos não estão limitados aos organismos complexos: canais iônicos desempenham papéis importantes nas respostas das bactérias e de outros organismos unicelulares aos sinais ambientais.

Para ilustrar a ação dos canais iônicos na sinalização célula a célula, descreveremos agora os mecanismos pelos quais um neurônio passa um sinal ao longo de sua extensão, através de uma sinapse, para o próximo neurônio (ou para um miócito), num circuito celular, usando a acetilcolina como neurotransmissor.

O receptor nicotínico da acetilcolina é um canal iônico aberto por um ligante

Um dos mais conhecidos exemplos de um canal aberto por um ligante ao receptor é o **receptor nicotínico da acetilcolina** (veja Fig. 12-39). O receptor do canal abre-se em resposta ao neurotransmissor acetilcolina (também à nicotina, daí o nome). Esse receptor é encontrado na membrana pós-sináptica dos neurônios em certas sinapses e nas fibras musculares (miócitos) nas junções neuromusculares.



$$CH_3-\overset{+}{N}(CH_3)_2-CH_2CH_2O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$$

Acetilcolina (Ach)

A acetilcolina, liberada por um neurônio excitado, difunde-se alguns micrômetros através da fenda sináptica, ou junção neuromuscular, até ao neurônio pós-sináptico ou ao miócito, onde interage com o receptor da acetilcolina e desencadeia a excitação elétrica (despolarização) da célula. O receptor da acetilcolina é uma proteína alostérica, situada a cerca de 3nm da entrada do íon, com dois sítios de ligação de alta afinidade para a acetilcolina nas suas duas subunidades α. A ligação da acetilcolina produz uma alteração da conformação fechada para a aberta. O processo é positivamente cooperativo: a ligação da acetilcolina ao primeiro sítio aumenta a afinidade da ligação da acetilcolina ao segundo sítio. Quando a célula pré-sináptica libera um pulso de acetilcolina, ambos os sítios no receptor da célula pós-sináptica são ocupados rapidamente e o canal se abre (Fig. 13-4). Tanto o

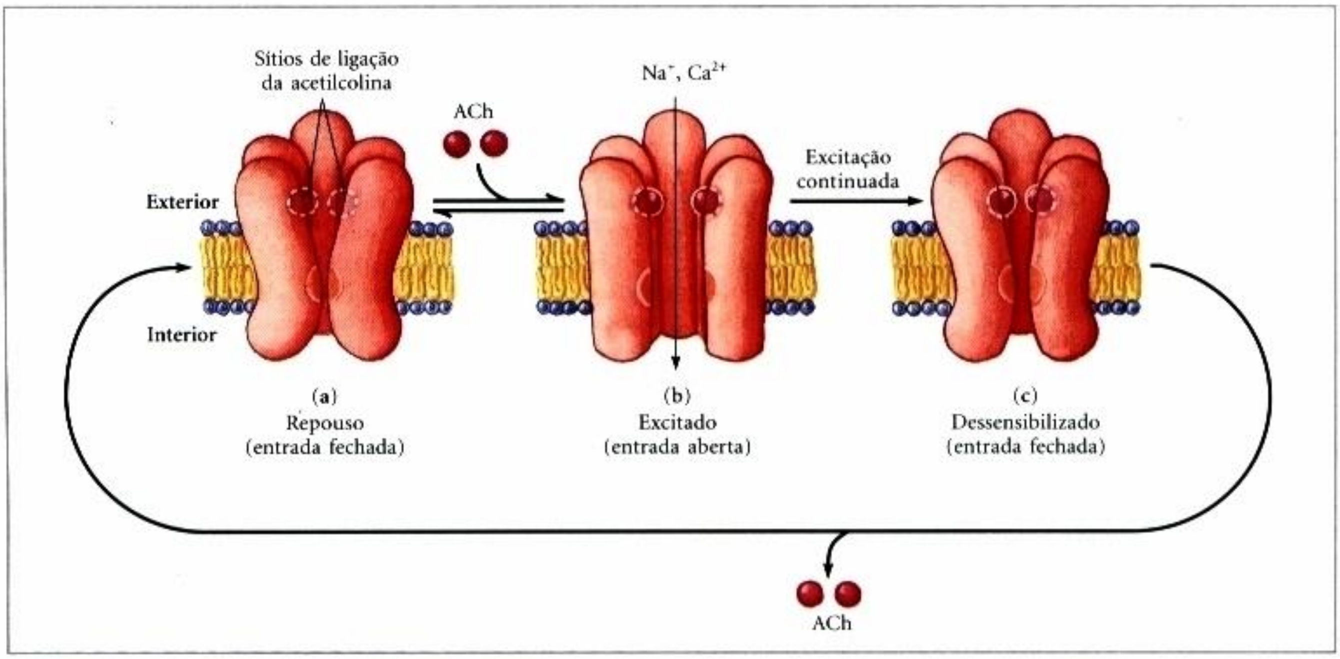


Figura 13-4 – Três estados do receptor da acetilcolina. Uma breve exposição do canal iônico em repouso (fechado) (**a**) à acetilcolina produz o estado excitado (aberto) (**b**). Uma exposição longa leva à dessensibilização e ao fechamento do canal (**c**).

Na^+ quanto o Ca^{2+} podem, agora, passar e o fluxo desses íons para dentro da célula despolariza a membrana plasmática iniciando os eventos subseqüentes que variam com o tipo de tecido. Em um neurônio pós-sináptico, a despolarização inicia um potencial de ação (veja a seguir); em uma junção neuromuscular, a despolarização da fibra muscular desencadeia a contração muscular.

Normalmente, a concentração da acetilcolina na fenda sináptica é rapidamente diminuída pela enzima acetilcolinesterase, presente na fenda. Quando os níveis de acetilcolina permanecem altos por mais de alguns milissegundos, ocorre a dessensibilização do receptor (Fig. 13-1c). O receptor do canal é convertido a uma terceira conformação (Fig. 13-4c), na qual o canal está fechado e a acetilcolina fortemente ligada. A lenta liberação (em dezenas de milissegundos) da acetilcolina dos seus sítios de ligação, finalmente, permite ao receptor retornar a seu estado de repouso — fechado e ressensibilizado aos níveis de acetilcolina.

Canais iônicos abertos por voltagem produzem potenciais de ação neuronal

A sinalização no sistema nervoso é executada por redes de neurônios, células especializadas que transportam um impulso nervoso (potencial de ação) da extremidade de uma célula (o corpo celular) através de uma extensão citoplasmática alongada (o axônio). O sinal elétrico desencadeia a liberação de moléculas do neurotransmissor na sinapse, transportando o sinal para a próxima célula no circuito. Três tipos de canais iônicos dependentes de voltagem são essenciais para esse mecanismo de sinalização. Ao longo de toda a extensão do axônio estão os **canais de Na^+ dependentes de voltagem** (Fig. 13-5; veja também Fig. 12-40), que estão fechados quando a membrana está em repouso ($V_m = -60mV$), mas se abrem rapidamente quando a membrana é despolarizada localmente, em resposta à acetilcolina (ou algum outro neurotransmissor). A despolarização induzida pela abertura dos canais de Na^+ força os **canais de K^+ dependentes de voltagem** a se abrirem, e o efluxo de K^+ resultante repolariza a membrana localmente. Um rápido pulso de despolarização atravessa o axônio à medida que despolarizações locais desencadeiam uma rápida abertura de canais de Na^+ vizinhos e depois de canais de K^+. Após cada abertura de um canal de Na^+, segue-se um curto período refratário durante o qual aquele canal não consegue se abrir novamente e, portanto, uma onda unidirecional de despolarização move-se rapidamente do corpo celular do neurônio para a extremidade do axônio. A sensibilidade à voltagem dos canais iônicos é devida à presença, em posições críticas, de cadeias laterais de aminoácidos carregados, que interagem com o campo elétrico através da membrana. Alterações no potencial transmembrana produzem mudanças conformacionais sutis na proteína do canal (veja Fig. 12-40).

Na extremidade distal do axônio estão os **canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem**. Quando a onda de despolarização os atinge, eles se abrem e o Ca^{2+} entra, vindo do espaço extracelular. Agindo como um mensageiro intracelular secundário, o Ca^{2+} desencadeia então a liberação de acetilcolina por exocitose na fenda sináptica (veja ③ na Fig. 13-5). A acetilcolina se difunde à célula pós-sináptica (um outro neurônio ou miócito), onde ela se liga ao receptor de acetilcolina e desencadeia a despolarização. Dessa forma, a mensagem é passada para a próxima célula do circuito.

Notamos, então, que os canais iônicos transmitem sinais de duas maneiras: alterando a concentração citosólica de um íon (como o Ca^{2+}), que funciona como um mensageiro intracelular secundário, ou alterando o V_m e afetando outras proteínas de

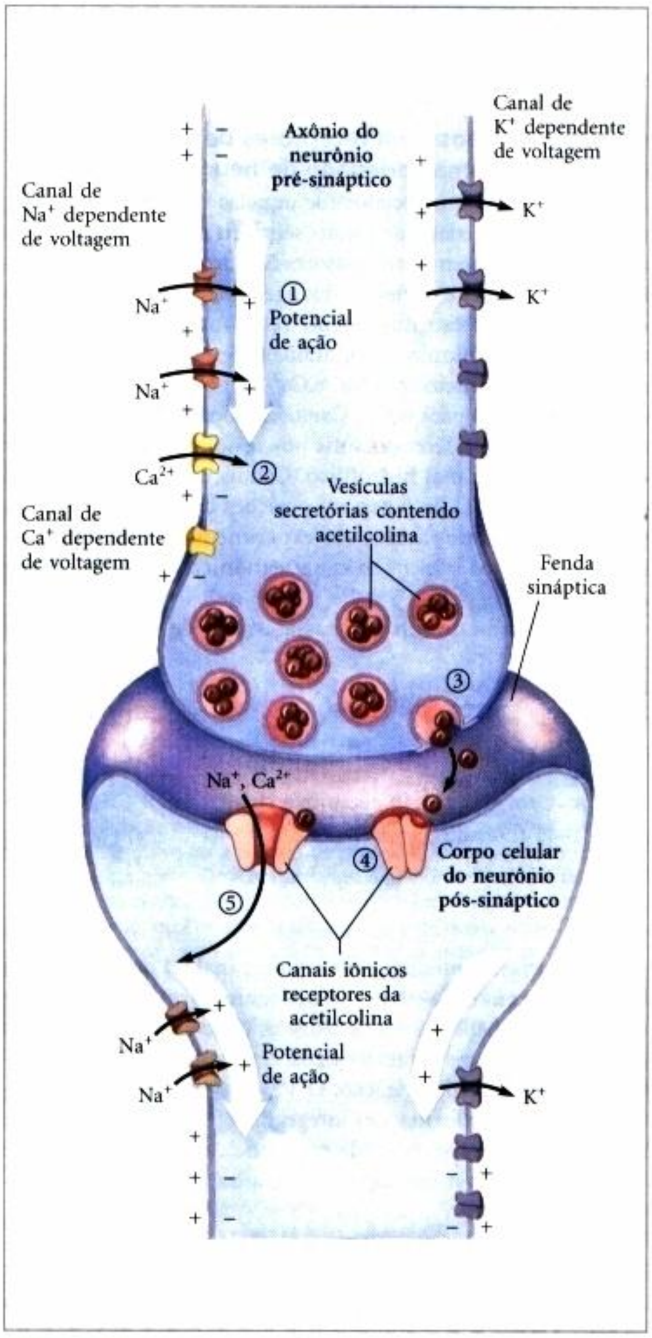

Axônio do neurônio pré-sináptico
Canal de K^+ dependente de voltagem
Canal de Na^+ dependente de voltagem
K^+
Na^+
① Potencial de ação
K^+
Na^+
Ca^{2+}
②
Vesículas secretórias contendo acetilcolina
Canal de Ca^+ dependente de voltagem
Fenda sináptica
③
Na^+, Ca^{2+}
④
Corpo celular do neurônio pós-sináptico
⑤
Canais iônicos receptores da acetilcolina
Na^+
Potencial de ação
Na^+
K^+

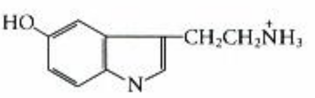
Figura 13-5 – Papel dos canais iônicos abertos por voltagem e por ligantes na transmissão neural. Inicialmente, a membrana plasmática do neurônio pré-sináptico é polarizada (interior negativo) por meio da ação da ATPase Na^+K^+ eletrogênica que bombeia 3 Na^+ para fora para cada 2 K^+ bombeados para dentro do neurônio (veja Fig. 12-33). ① Um estímulo a esse neurônio produz um potencial de ação que se move ao longo do axônio (seta branca), distante do corpo celular. A abertura de um canal de Na^+ dependente de voltagem permite que o Na^+ entre e a resultante despolarização local induz à abertura dos canais de Na^+ adjacentes, e assim por diante. A direcionalidade do movimento do potencial de ação é garantida pelo breve período refratário que se segue à abertura de cada canal de Na^+ aberto por voltagem. ② Quando a onda de despolarização alcança a extremidade do axônio, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem se abrem, permitindo a entrada de Ca^{2+} no neurônio pré-sináptico. ③ O resultante aumento da $[Ca^{2+}]$ interna desencadeia a liberação exocítica do neurotransmissor acetilcolina dentro da fenda pré-sináptica. ④ A acetilcolina se liga a um receptor no neurônio pós-sináptico, induzindo à abertura do canal iônico dependente de ligante. ⑤ O Na^+ e o Ca^{2+} extracelulares entram através desse canal, despolarizando a célula pós-sináptica. O sinal elétrico passou, dessa forma, para o corpo celular do neurônio pós-sináptico e se moverá ao longo do seu axônio para um terceiro neurônio, por meio da mesma seqüência de eventos.

membrana que são sensíveis ao V_m. A passagem de um sinal elétrico através de um neurônio para o próximo ilustra ambos os tipos de mecanismos.

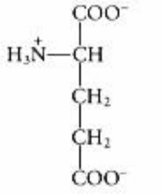
Os neurônios possuem receptores de canais que respondem a uma variedade de neurotransmissores

As células animais, especialmente aquelas do sistema nervoso, contêm uma variedade de canais sensíveis a ligantes, voltagem ou a ambos. Os neurotransmissores 5-hidroxitriptamina (serotonina), glutamato e glicina, todos agem por meio de receptores de canais que são estruturalmente relacionados ao receptor da acetilcolina. A serotonina e o glutamato desencadeiam a abertura de canais catiônicos (K^+, Na^+ e Ca^{2+}), enquanto a glicina abre canais específicos para o Cl^-. Canais catiônicos e aniônicos são distinguíveis por diferenças sutis nos resíduos de aminoácidos que revestem o canal hidrofílico. Canais catiônicos possuem cadeias laterais de Glu e Asp em posições cruciais. Quando alguns desses resíduos ácidos são experimentalmente substituídos por resíduos básicos, o canal catiônico é convertido em canal aniônico.

Dependendo do íon que passa através de um canal, o ligante (neurotransmissor) para aquele canal ou despolariza ou hiperpolariza a célula-alvo. Um neurônio normalmente recebe impulsos de vários outros neurônios, cada um liberando seus neurotransmissores característicos, com seus efeitos de despolarização ou hiperpolarização. O V_m de uma célula-alvo, portanto, reflete as informações integradas (Fig. 13-1d) vindas de múltiplos neurônios. A célula responde com um potencial de ação apenas se as informações integradas levarem a uma despolarização.



Serotonina
(5-Hidroxitriptamina)



$H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-COO^-$

Glutamato

Os receptores de canais para a acetilcolina, a glicina, o glutamato e o γ-aminobutírico (GABA) são abertos por ligantes *extra*celulares. Mensageiros *intra*celulares secundários — como cAMP, cGMP (3',5'-GMP cíclico, um análogo próximo do cAMP), IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato), Ca^{2+} e ATP — regulam os canais iônicos de uma outra classe que, como veremos adiante, participa na transdução sensorial da visão, olfato e gustação.

Receptores Enzimáticos

Um mecanismo fundamentalmente diferente de transdução de sinais é realizado pelos receptores enzimáticos. Essas proteínas possuem um domínio de ligação a um ligante na superfície extracelular da membrana plasmática e um sítio ativo de uma enzima no lado citosólico, com os dois domínios conectados por um único segmento transmembrana. Mais comumente, o receptor enzimático é uma proteína quinase que fosforila resíduos de tirosina em proteínas-alvo específicas; o receptor da insulina é o protótipo desse grupo. Outros receptores enzimáticos sintetizam o mensageiro intracelular secundário cGMP em resposta a sinais extracelulares. O receptor para o fator atrial natriurético é típico deste tipo.

O receptor da insulina é uma proteína tirosina quinase específica

A insulina regula tanto o metabolismo quanto a expressão gênica: o sinal da insulina passa do receptor da membrana plasmática para as enzimas do metabolismo sensíveis à insulina e ao núcleo, onde estimula a transcrição de genes específicos. O receptor ativo da insulina consiste de duas cadeias α idênticas projetando-se para a face externa da membrana plasmática e duas subunidades β transmembrana com sua carboxiterminal projetando-se dentro do citosol (Fig. 13-6). As cadeias α contêm o domínio de ligação da insulina e os domínios intracelulares das cadeias β contêm a atividade da proteína quinase que transfere um grupo fosforila do ATP para o grupo hidroxila dos resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas. A sinalização por meio do receptor da insulina está ilustrada na Figura 13-7. Ela começa (etapa ①) quando a ligação da insulina às cadeias α ativa as cadeias β da tirosina quinase e cada monômero αβ fosforila resíduos Tyr críticos próximos do carboxiterminal da cadeia β do seu parceiro no dímero. Essa autofosforilação abre o sítio ativo, permitindo que a enzima fosforile resíduos de Tyr de outras proteínas-alvo.

Uma dessas proteínas-alvo (etapa ②) é o substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1 — "*i*nsulin *r*eceptor *s*ubstrate"). Assim que fosforilado nos resíduos de Tyr, IRS-1 torna-se o ponto de nucleação de um complexo de proteínas (etapa ③) que transporta a mensagem do receptor da insulina aos alvos finais no citosol e no núcleo, através de uma longa série de proteínas intermediárias. Primeiro, um resíduo de Ⓟ-Tyr na IRS-1 é ligado

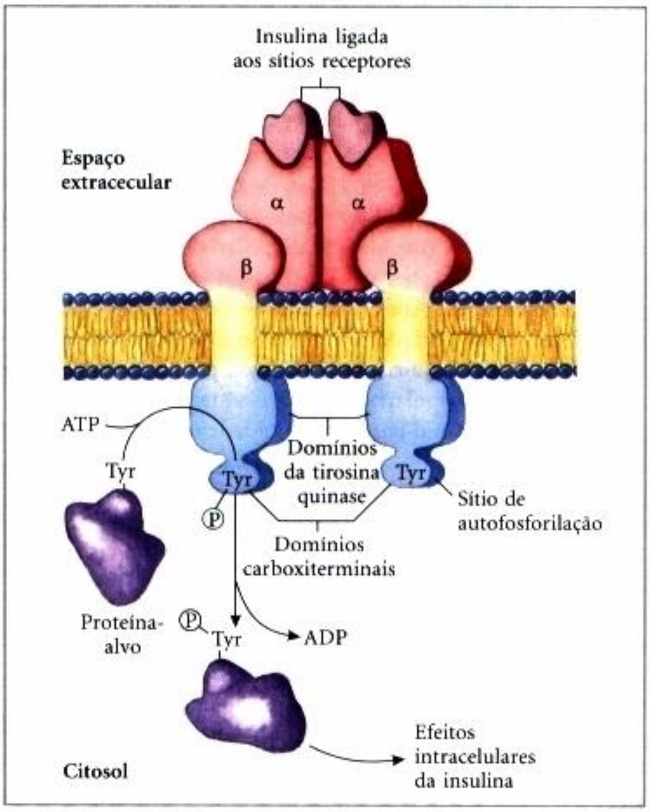
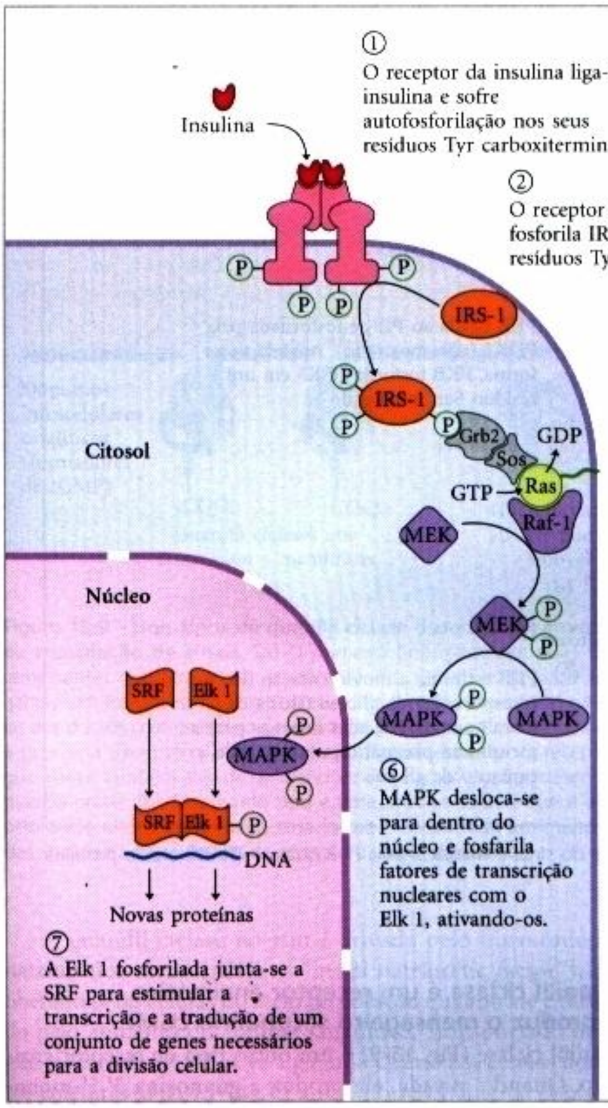


Figura 13-6 – Receptor da insulina. Quando ativado pela insulina, o receptor consiste de duas cadeias α na superfície externa da membrana plasmática e duas cadeias β que atravessam a membrana e se lançam na face citosólica. A ligação da insulina às cadeias α desencadeia a dimerização de ambas as unidades αβ para formar o complexo $\alpha_2\beta_2$ e autofosforilar os resíduos Tyr no domínio carboxiterminal das subunidades β. A autofosforilação ativa o domínio da tirosina quinase, que então catalisa a fosforilação de outras proteínas-alvo.



① O receptor da insulina liga-se à insulina e sofre autofosforilação nos seus resíduos Tyr carboxiterminais.

② O receptor de insulina fosforila IRS-1 nos seus resíduos Tyr.

③ O domínio SH2 da Grb2 liga-se ao Ⓟ-Tyr da IRS-1. Sos se liga a Grb2, depois à Ras, provocando a liberação de GDP e a ligação do GTP à Ras.

④ Ras ativada liga-se à Raf-1 e a ativa.

⑤ Raf-1 fosforila MEK em dois resíduos Ser, ativando-a. MEK fosforila MAPK em um resíduo Thr e em um resíduo Tyr, ativando-a.

⑥ **MAPK desloca-se para dentro do núcleo e fosfarila fatores de transcrição nucleares com o Elk 1, ativando-os.**

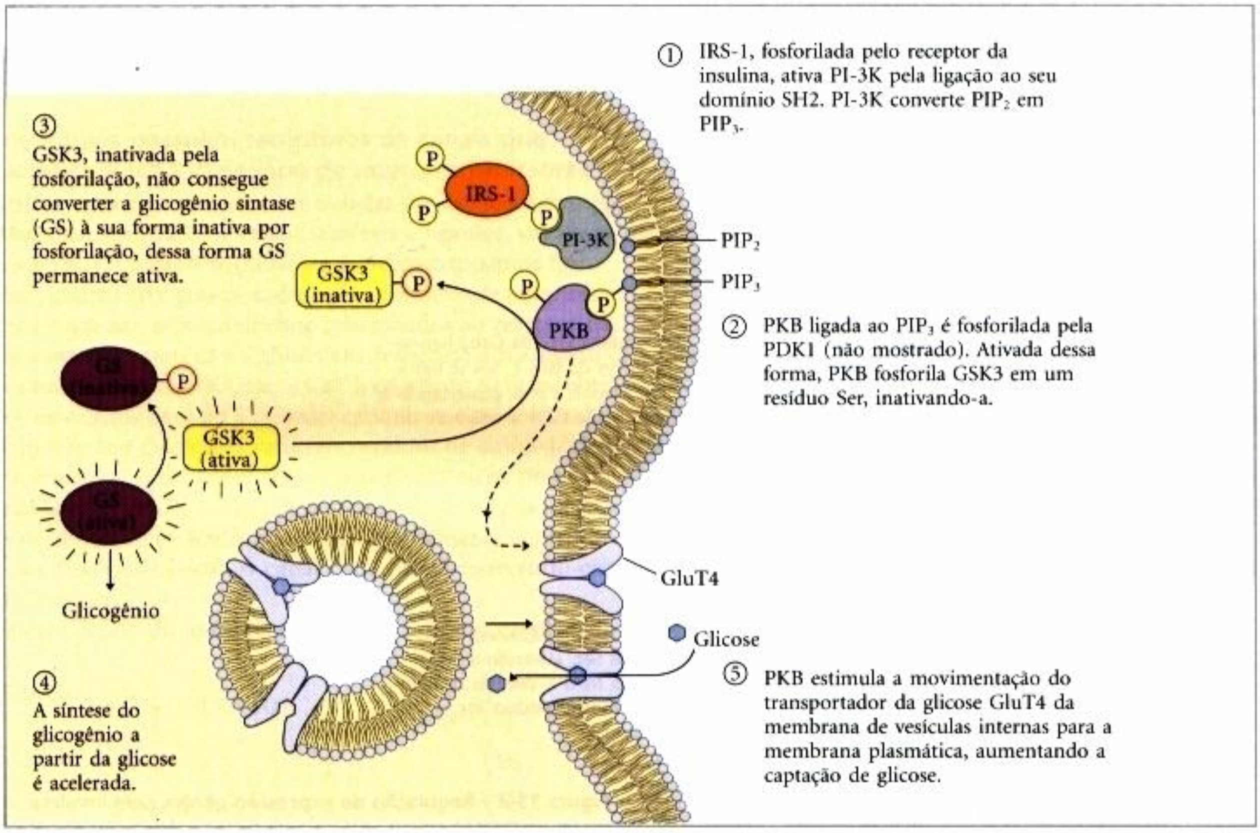
⑦ **A Elk 1 fosforilada junta-se a SRF para estimular a transcrição e a tradução de um conjunto de genes necessários para a divisão celular.**

Figura 13-7 – Regulação da expressão gênica pela insulina. A via de sinalização pela qual a insulina regula a expressão de genes específicos envolve uma cascata de proteínas quinases, cada uma ativando a seguinte. O receptor da insulina é uma tirosina quinase específica, as outras quinases (todas mostradas em azul) fosforilam resíduos de Ser ou Thr. MEK é uma quinase de dupla especificidade, que fosforila tanto um resíduo de Thr quanto um de Tyr em MAPK. A MAPK é algumas vezes chamada de ERK ("*e*xtracellular *r*egulatated *k*inase", quinase regulada extracelularmente); MEK é ativada por mitógenos; SRF ("*s*erum *r*esponse *f*actor") é um fator de resposta ao soro.

ao domínio **SH2** da proteína Grb2. (SH2 é a abreviação de "*S*rc *h*omology *2*"; as seqüências de domínios de SH2 são semelhantes a um domínio em uma proteína chamada Src. Várias proteínas sinalizadoras contêm domínios SH2, todas as quais se ligam a resíduos de Ⓟ-Tyr em uma proteína parceira). Grb2, por seu lado, recruta uma outra proteína, Sos, para o complexo em crescimento. Quando ligada à Grb2, Sos catalisa a substituição do GDP por GTP ligado em Ras, uma de uma família de proteínas de ligação de nucleotídeos de guanosina (**proteínas G**) que medeiam uma grande variedade de transdução de sinais. Quando o GTP estiver ligado em Ras, poderá ativar uma proteína quinase, Raf-1 (etapa ④), a primeira de três proteínas quinases (Raf-1, MEK e MAPK) que formam uma cascata na qual cada quinase ativa a seguinte pela fosforilação de um resíduo Ser (etapa ⑤). A última proteína quinase, a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), é ativada pela fosforilação tanto de um resíduo de Thr quanto de um de Tyr. Quando ativada, ela medeia alguns dos efeitos biológicos da insulina entrando no núcleo e fosforilando proteínas como Elk 1, que modula a transcrição de certos genes regulados pela insulina (etapa ⑥).

Os bioquímicos reconhecem agora que a via da insulina é apenas um exemplo de um tema mais geral no qual sinais hormonais, através de vias semelhantes à mostrada na Figura 13-7, levam à fosforilação de enzimas-alvo por proteínas quinases. O alvo da fosforilação é freqüentemente uma outra proteína quinase, que então fosforila uma terceira proteína quinase, e assim por diante. O resultado de um catalisador ativando um segundo catalisador que por sua vez ativa um terceiro catalisador é uma cascata de reações que amplifica o sinal inicial em várias ordens de grandeza (Fig. 13-1b).

Grb2 não é a única proteína ativada pela associação com a IRS-1 fosforilada. A PI-3 quinase (PI-3K) associa-se com a IRS-1 por meio de seu domínio SH2 (Fig. 13-8). Ativada dessa forma, PI-3K converte o fosfolipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (veja Fig. 11-13), também chamado de PIP_2, em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), que indiretamente ativa uma outra quinase, a proteína quinase B (PKB). Quando ligada a PIP_3, PKB é fosforilada e ativada por uma outra proteína quinase, PDK1. PKB fosforila então resíduos de Ser ou Thr nas suas proteínas-alvo, uma das quais é a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). Na sua forma ativa, não-fosforilada, a GSK3 fosforila a glicogênio sintase, inativando-a e, portanto, diminuindo a síntese do glicogênio. Quando fosforilada pela PKB, GSK3 é inativada. Dessa forma, prevenindo a inativação da glicogênio sintase, a cascata da fosforilação de proteínas iniciada pela insulina estimula a síntese do glicogênio (Fig. 13-8). Acredita-se também que a PKB desencadeie o movimento dos transportadores da glicose (GluT4) das vesículas internas até a membrana plasmática, estimulando a captação da glicose do sangue (veja Adendo 12-2).



① IRS-1, fosforilada pelo receptor da insulina, ativa PI-3K pela ligação ao seu domínio SH2. PI-3K converte PIP_2 em PIP_3.

② PKB ligada ao PIP_3 é fosforilada pela PDK1 (não mostrado). Ativada dessa forma, PKB fosforila GSK3 em um resíduo Ser, inativando-a.

③ GSK3, inativada pela fosforilação, não consegue converter a glicogênio sintase (GS) à sua forma inativa por fosforilação, dessa forma GS permanece ativa.

④ A síntese do glicogênio a partir da glicose é acelerada.

⑤ PKB estimula a movimentação do transportador da glicose GluT4 da membrana de vesículas internas para a membrana plasmática, aumentando a captação de glicose.

Figura 13-8 – Ativação da glicogênio sintase pela insulina. A transmissão do sinal é mediada pela PI-3 quinase (PI-3K) e pela proteína quinase B (PKB).

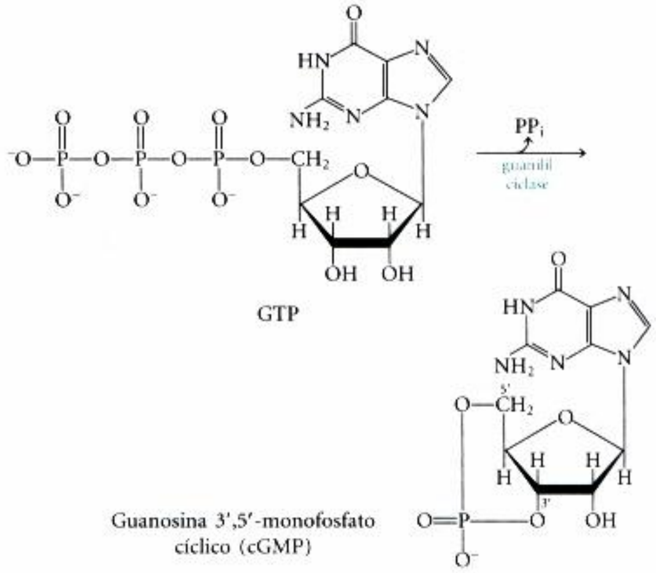
O que impulsiona a evolução de sistema tão complicado de regulação? Esse sistema permite que um receptor ativado ative várias moléculas de IRS-1, amplificando o sinal da insulina, o que proporciona a integração de sinais de vários receptores, cada um dos quais pode fosforilar IRS-1. Além disso, pelo fato de IRS-1 poder ativar qualquer uma de várias proteínas que contêm domínios SH2, um único receptor atuando por meio de IRS-1 pode desencadear duas ou mais vias de sinalização; a insulina afeta a expressão gênica por meio da via Grb2-Sos-Ras-MAPK e afeta o metabolismo do glicogênio por meio da via PI-3K-PKB.

O receptor da insulina é o protótipo de vários receptores enzimáticos que possuem uma estrutura semelhante e uma atividade de proteína tirosina quinase. Os receptores para o fator de crescimento epitelial e o fator de crescimento derivado das plaquetas, por exemplo, apresentam semelhanças estruturais e de seqüência com o receptor da insulina e ambos possuem uma atividade tirosina quinase que fosforila IRS-1. Muitos desses receptores dimerizam após a ligação do ligante; o receptor da insulina já é um dímero antes de a insulina se ligar.

Em adição aos muitos receptores que atuam como proteínas tirosina quinases, várias proteínas que se assemelham aos receptores da membrana plasmática possuem uma atividade de proteína tirosina fosfatase. Baseando-se na estrutura dessas proteínas, podemos supor que seus ligantes são componentes da matriz extracelular ou da superfície de outras células. Embora seus papéis de sinalização não sejam ainda bem entendidos como aqueles das proteínas tirosina quinases, elas claramente possuem o potencial de reverter a ação dos sinais que estimulam essas quinases.

A guanilil ciclase é um receptor enzimático que produz o mensageiro secundário cGMP

A guanilil ciclase (Fig. 13-9) é um outro tipo de receptor enzimático. Quando ativada, ela produz a **guanosina 3',5'-monofosfato cíclico** (**GMP cíclico** ou **cGMP**) a partir do GTP:



GTP

Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP)

O GMP cíclico é um mensageiro secundário que transporta diferentes mensagens em diferentes tecidos. No rim e no intestino, ele desencadeia alterações no transporte iônico e na retenção de água; no músculo cardíaco, ele sinaliza relaxamento; no cérebro, ele pode estar envolvido tanto no desenvolvimento como nas funções do cérebro adulto.

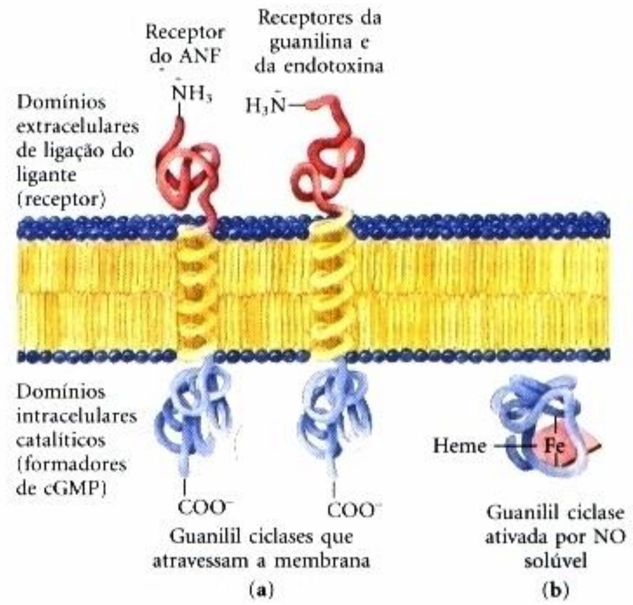
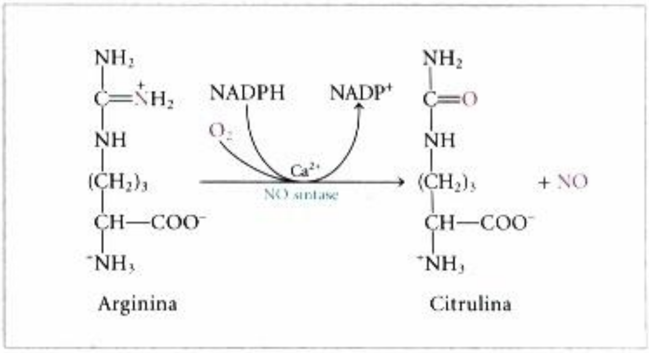

Receptor do ANF
Receptores da guanilina e da endotoxina
Domínios extracelulares de ligação do ligante (receptor)
$\overset{+}{N}H_3$
$H_3\overset{+}{N}$
Domínios intracelulares catalíticos (formadores de cGMP)
Heme
Fe
COO⁻
COO⁻
Guanilil ciclases que atravessam a membrana
(a)
Guanilil ciclase ativada por NO solúvel
(b)

Figura 13-9 – Dois tipos de guanilil ciclase (isoenzimas) envolvidos na transdução de sinais. (**a**) O primeiro tipo existe em duas formas semelhantes que atravessam a membrana e são ativadas pelos seus ligantes extracelulares: fator natriurético atrial (ANF) (receptores nas células dos ductos coletores renais e no músculo liso dos vasos sangüíneos) e a guanilina (receptores nas células epiteliais intestinais). O receptor da guanilina é também alvo de uma endotoxina bacteriana que desencadeia diarréia grave. (**b**) O segundo tipo é uma enzima solúvel que é ativada pelo óxido nítrico intracelular; essa forma é encontrada em muitos tecidos, incluindo músculo liso do coração e vasos sangüíneos.

A guanilil ciclase no rim é ativada pelo hormônio **fator natriurético atrial** (ANF — "*a*trial *n*atriuretic *f*actor"), que é liberado pelas células do átrio do coração quando ele é distendido pelo aumento do volume sangüíneo. Transportado no sangue até o rim, o ANF ativa a guanilil ciclase nas células dos ductos coletores (Fig. 13-9a). O aumento resultante na concentração do cGMP desencadeia o aumento na excreção renal do Na^+ e, conseqüentemente, de água. A perda de água reduz o volume sangüíneo, contrapondo-se ao estímulo que inicialmente levou à secreção do ANF. Os músculos lisos dos vasos sangüíneos também possuem um receptor guanilil ciclase para o ANF; ligando-se a esse receptor, o ANF produz um relaxamento do vaso sangüíneo (vasodilatação), que reduz a pressão sangüínea.

Um receptor guanilil ciclase semelhante, na membrana plasmática das células epiteliais do intestino, é ativado por um peptídeo intestinal, a **guanilina**, que regula a secreção de Cl^- no intestino. Esse receptor é também alvo de uma endotoxina peptídica estável ao calor, produzida pela *E. coli* e outras bactérias gram-negativas. A elevação na concentração de cGMP produzida pela endotoxina aumenta a secreção de Cl^- e, conseqüentemente, diminui a reabsorção da água pelo epitélio intestinal, produzindo a diarréia.

Uma isoenzima distintamente diferente da guanilil ciclase é uma proteína citosólica com um grupo heme fortemente associado (Fig. 13-9b). Essa enzima é ativada pelo óxido nítrico (NO). O óxido nítrico é produzido a partir da arginina pela **NO sintase**, dependente de Ca^{2+}, presente em muitos tecidos de mamíferos, e se difunde de sua célula de origem para as células próximas. O NO é suficientemente não-polar para atravessar as membranas plasmáticas sem um transportador. Na célula-alvo, ele se liga ao grupo heme da guanilil ciclase e ativa a produção de cGMP. No coração, o cGMP leva a contrações menos potentes, estimulando as bombas iônicas que expelem o Ca^{2+} do citosol.



Esse relaxamento induzido pelo NO no músculo cardíaco é semelhante à resposta induzida pelas cápsulas de nitroglicerina e outros nitrovasodilatadores que são ingeridos para aliviar a angina: a dor causada pela contração de um coração desprovido de O_2 por causa de artérias coronarianas bloqueadas. O óxido nítrico é instável e sua ação é rápida; dentro de segundos após sua formação, ele sofre oxidação a nitrito ou nitrato. Os nitrovasodilatadores produzem um relaxamento duradouro do músculo cardíaco porque se degradam após várias horas, mantendo uma concentração estável de NO.

Acredita-se que a maioria das ações do cGMP seja mediada pela **proteína quinase dependente de cGMP**, também chamada de **proteína quinase G** ou **PKG**, a qual fosforila resíduos de Ser e Thr nas proteínas-alvo quando ativada pelo cGMP. Os domínios regulatórios e catalíticos dessa enzima estão presentes em um polipeptídeo único (M_r ~80.000). A ligação do cGMP força uma parte semelhante ao substrato do domínio regulatório, para fora do sítio de ligação do substrato, ativando o domínio catalítico.

O GMP cíclico possui um segundo modo de ação no olho dos vertebrados: ele induz canais iônicos específicos a se abrirem nas células dos cones e bastonetes da retina. Voltaremos a esse papel do cGMP em nossa discussão sobre a visão.

Receptores Ligados à Proteína G e a Mensageiros Secundários

Um terceiro mecanismo de transdução de sinais, distinto dos canais iônicos e dos receptores enzimáticos, é definido por três componentes essenciais: um receptor na membrana plasmática com sete segmentos transmembrana, uma enzima na membrana plasmática que produz um mensageiro secundário e uma proteína ligante de GTP que se dissocia do receptor ocupado e se liga à enzima, ativando-a. O receptor β-adrenérgico, que medeia os efeitos da adrenalina (Fig. 13-10) em muitos tecidos, é o protótipo desse terceiro tipo de sistema de transdução.

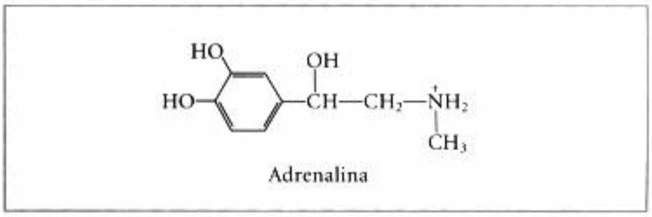


Figura 13-10 – Adrenalina. Esse composto, também chamado de adrenalina, é liberado das glândulas adrenais e regula o metabolismo energético no músculo, fígado e tecido adiposo. Ele também funciona como um neurotransmissor nos neurônios adrenérgicos.

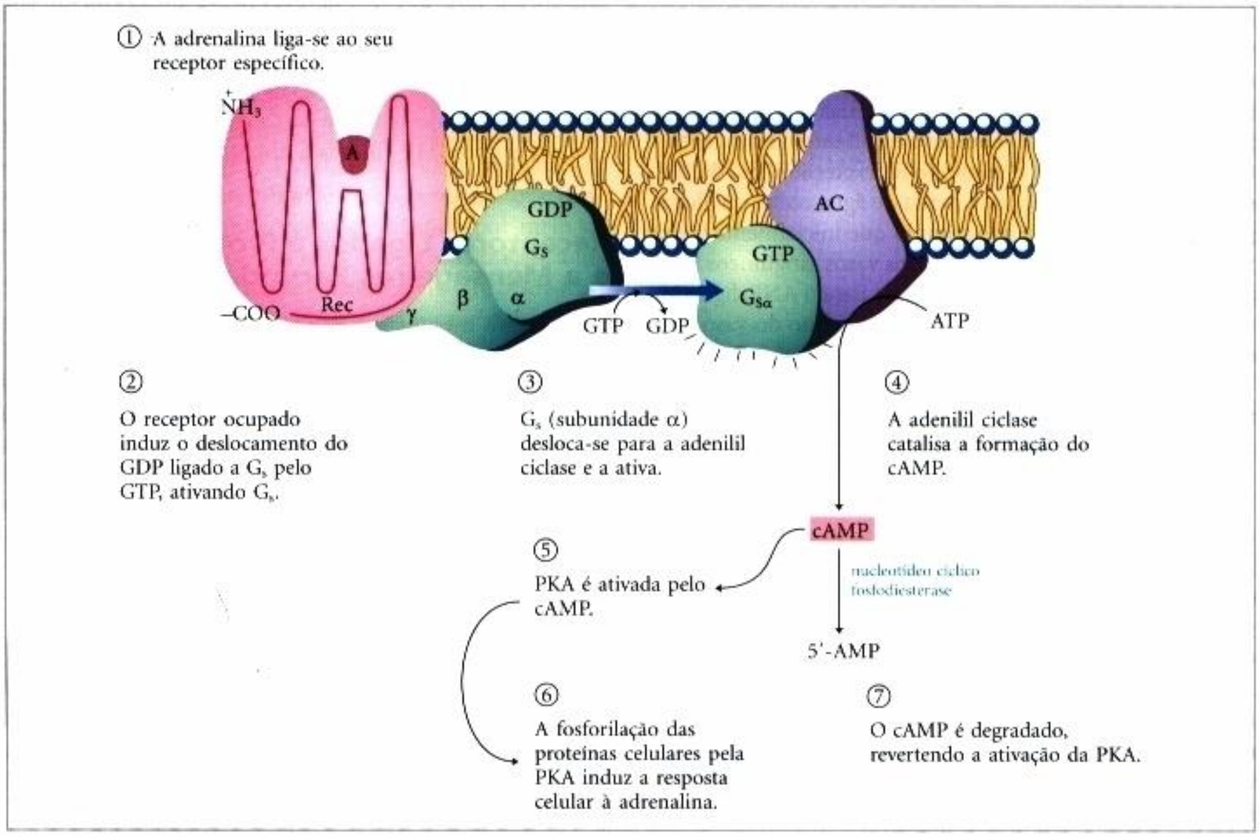
O sistema do receptor β-adrenérgico atua por meio do mensageiro secundário cAMP

A ação da adrenalina começa quando o hormônio se liga a uma proteína receptora na membrana plasmática de uma célula sensível ao hormônio. Os **receptores adrenérgicos** são de quatro tipos gerais, definidos por diferenças sutis em suas afinidades e respostas a um grupo de agonistas e antagonistas. Agonistas são análogos estruturais que se ligam a um receptor e mimetizam os efeitos de seu ligante natural; antagonistas são análogos que se ligam sem desencadear o efeito normal e, portanto, bloqueiam os efeitos dos agonistas. Os quatro tipos de receptores adrenérgicos (α_1, α_2, β_1, β_2) são encontrados em tecidos-alvo diferentes e medeiam respostas diferentes à adrenalina. Aqui focalizaremos os **receptores β-adrenérgicos** do músculo, fígado e tecido adiposo. Esses receptores medeiam alterações no metabolismo energético, como descrito no Capítulo 23, incluindo o aumento na degradação do glicogênio e das gorduras.

O receptor β-adrenérgico é uma proteína integral com sete regiões hidrofóbicas de 20 a 28 resíduos que serpenteiam para trás e para a frente, sete vezes, através da membrana plasmática. Essa proteína é membro de uma família muito grande de receptores, todos com sete hélices transmembrana, que são comumente chamados de **receptores serpenteantes.** A ligação da adrenalina a um sítio profundo no receptor dentro da membrana (Fig. 13-11, etapa ①) aparentemente promove uma alteração conformacional no domínio intracelular do receptor que permite sua interação com a segunda proteína na via de transdução de sinais, uma **proteína G estimulatória**, trimérica, que se liga ao GTP, ou $\mathbf{G_s}$ ("*G s*timulatory"), no lado citosólico da membrana plasmática. Alfred G. Gilman e Martin Rodbell descobriram que, quando o GTP está ligado à G_s, ele estimula a produção de cAMP pela **adenilil ciclase** (veja pág. 351) na membrana plasmática. A função de G_s, como um interruptor molecular, assemelha-se àquela de uma outra classe de proteína G tipificada pela Ras, discutida anteriormente no contexto do receptor da insulina. Estruturalmente, G_s e Ras são bastante distintas; proteínas G do tipo Ras são monômeros de cerca de 20kDa, enquanto as proteínas G que interagem com os receptores serpenteantes são trímeros de três subunidades diferentes, α (M_r 43.000), β (M_r 7.500) e γ (M_r 10.000).

Alfred G. Gilman

Martin Rodbell
(1925-1998)



① A adrenalina liga-se ao seu receptor específico.

② O receptor ocupado induz o deslocamento do GDP ligado a G_s pelo GTP, ativando G_s.

③ G_s (subunidade α) desloca-se para a adenilil ciclase e a ativa.

④ A adenilil ciclase catalisa a formação do cAMP.

⑤ PKA é ativada pelo cAMP.

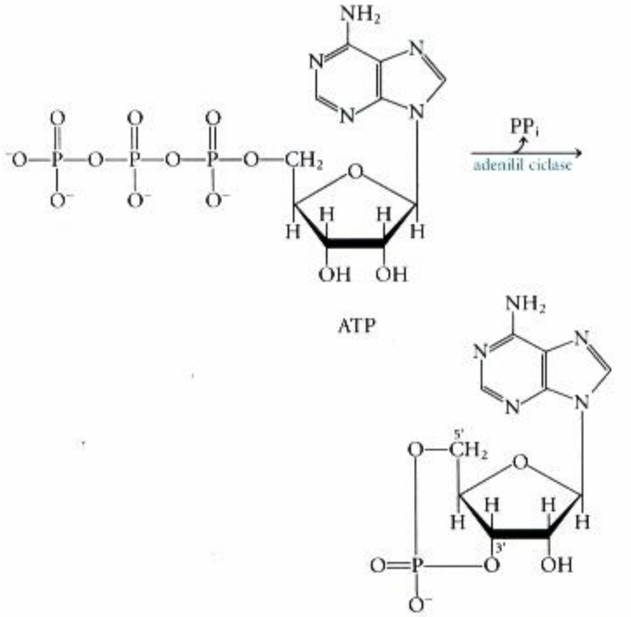
⑥ A fosforilação das proteínas celulares pela PKA induz a resposta celular à adrenalina.

⑦ O cAMP é degradado, revertendo a ativação da PKA.

Figura 13-11 – Transdução do sinal da adrenalina: a via β-adrenérgica. As sete etapas do mecanismo que acopla a ligação da adrenalina (A) ao seu receptor (Rec) com ativação da adenilil ciclase (AC) são discutidas no texto. A mesma molécula da adenilil ciclase na membrana plasmática pode ser regulada por uma proteína G estimulatória (G_s), como mostrado, ou uma proteína G inibitória (G_i), não mostrada. G_s e G_i estão sobre a influência de hormônios diferentes. Os hormônios que induzem a ligação do GTP em G_i produzem uma *inibição* da adenilil ciclase, resultando na diminuição da [cAMP] celular.

Quando o sítio de ligação do nucleotídico da G_s (na subunidade α) estiver ocupado pelo GTP, G_s estará ativa e poderá ativar a adenilil ciclase; com o GDP ligado ao sítio, G_s estará inativa. A ligação da adrenalina capacita o receptor a catalisar o deslocamento do GDP ligado pelo GTP, convertendo G_s à sua forma ativa (Fig. 13-11, etapa ②). À medida que isso ocorre, as subunidades β e γ da G_s dissociam-se da subunidade α e $G_{s\alpha}$ com seu GTP ligado, move-se no plano da membrana do receptor para uma molécula próxima, de adenilil ciclase (etapa ③). A $G_{s\alpha}$ é mantida ligada covalentemente à membrana por um lipídio.

A **adenilil ciclase** (Fig. 13-12) é uma proteína integral da membrana plasmática com seu sítio ativo na face citosólica. Ela catalisa a síntese do cAMP a partir do ATP.



ATP

Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)

A associação da $G_{s\alpha}$ com a adenilil ciclase estimula a enzima a catalisar a síntese do cAMP (Fig. 13-11, etapa ④), elevando a [cAMP] citosólica. Essa estimulação pela $G_{s\alpha}$ é autolimitante; $G_{s\alpha}$ é uma GTPase que se desliga convertendo seu GTP ligado em GDP (Fig. 13-13). A $G_{s\alpha}$, agora inativa, dissocia-se da adenilil ciclase, tornando a enzima inativa. Depois que a $G_{s\alpha}$ se reassocia com as subunidades β e γ ($G_{s\beta\gamma}$), G_s estará novamente disponível a interagir com um receptor ligado ao hormônio.

Um efeito da adrenalina é ativar a fosforilase *b* do glicogênio. Essa conversão é promovida pela enzima fosforilase *b* quinase, que catalisa a fosforilação de dois resíduos específicos de Ser na fosforilase *b*, convertendo-a em fosforilase *a* (veja Fig. 8-28). O AMP cíclico não afeta a fosforilase *b* quinase diretamente. Mais precisamente a **proteína quinase dependente de cAMP**, também chamada de **proteína quinase A** ou **PKA**, que é alostericamente ativada pelo cAMP, catalisa a fosforilação da fosforilase *b* quinase inativa, produzindo a forma ativa (etapas ⑤ e ⑥ na Fig. 13-11).

A forma inativa da PKA contém duas subunidades catalíticas (C) e duas subunidades regulatórias (R) (Fig. 13-14a), que são semelhantes em seqüência aos domínios catalíticos e regulatórios da PKG (proteína quinase dependente de cGMP). O complexo tetramérico R_2C_2 é cataliticamente inativo, porque um domínio auto-inibitório de cada subunidade R ocupa o sítio de ligação do substrato de cada subunidade C. Quando o cAMP se

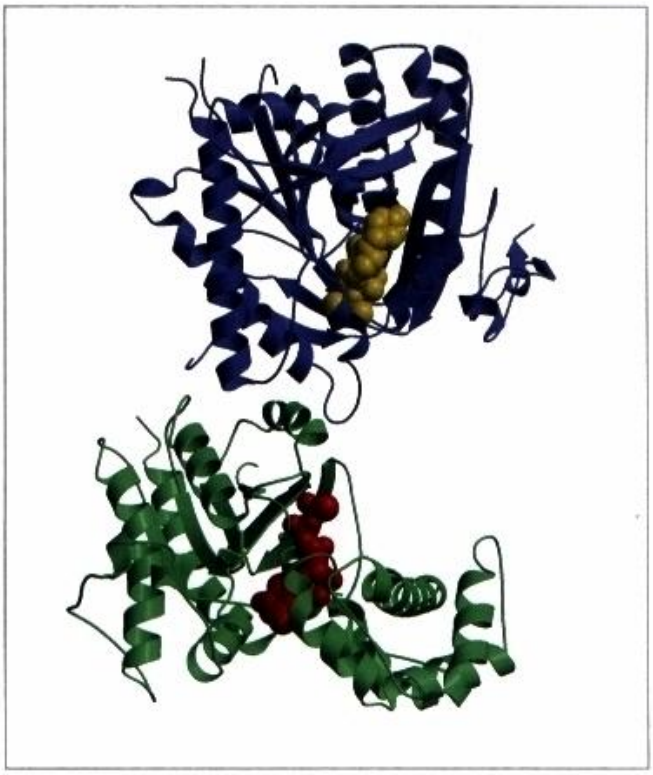
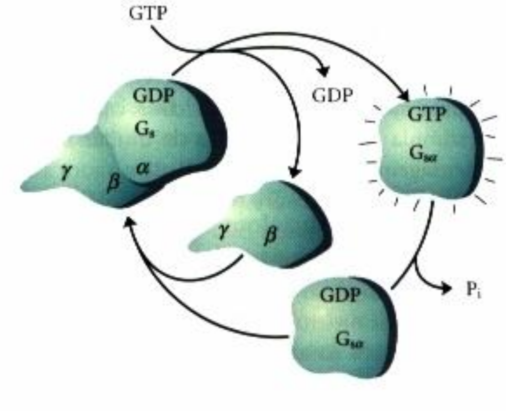


Figura 13-12 – A interação da $G_{s\alpha}$ com a adenilil ciclase. O núcleo catalítico solúvel da adenilil ciclase (azul), separado de sua âncora na membrana, foi co-cristalizado com $G_{s\alpha}$ (verde) para dar esta estrutura de cristal. O terpeno de plantas forskolin (amarelo) é uma droga que estimula fortemente a enzima, e o GTP (vermelho) ligado à $G_{s\alpha}$ desencadeia a interação de $G_{s\alpha}$ com a adenilil ciclase.

① G_s com o GDP ligado é desativada; ela não consegue ativar a adenilil ciclase.

② O contado da G_s com o complexo hormônio-receptor induz o deslocamento do GDP ligado pelo GTP.

③ G_s com o GTP ligado se dissocia nas subunidades α e βγ. $G_{s\alpha}$-GTP é acionado; ele pode ativar a adenilil ciclase.



④ GTP ligado a $G_{S\alpha}$ é hidrolisado pela proteína de GTPase intrínseca; $G_{S\alpha}$ tornando-o, portanto, inativo. A subunidade α inativa reassocia-se com as subunidades β e γ

Figura 13-13 – A auto-inativação de G_s. As etapas são descritas no texto. A atividade GTPase intrínseca da proteína, estimulada pelas proteínas RGS ("regulators of G protein signaling), determina quanto rapidamente o GTP ligado é hidrolisado em GDP e, portanto, por quanto tempo a proteína G permanecerá ativa.

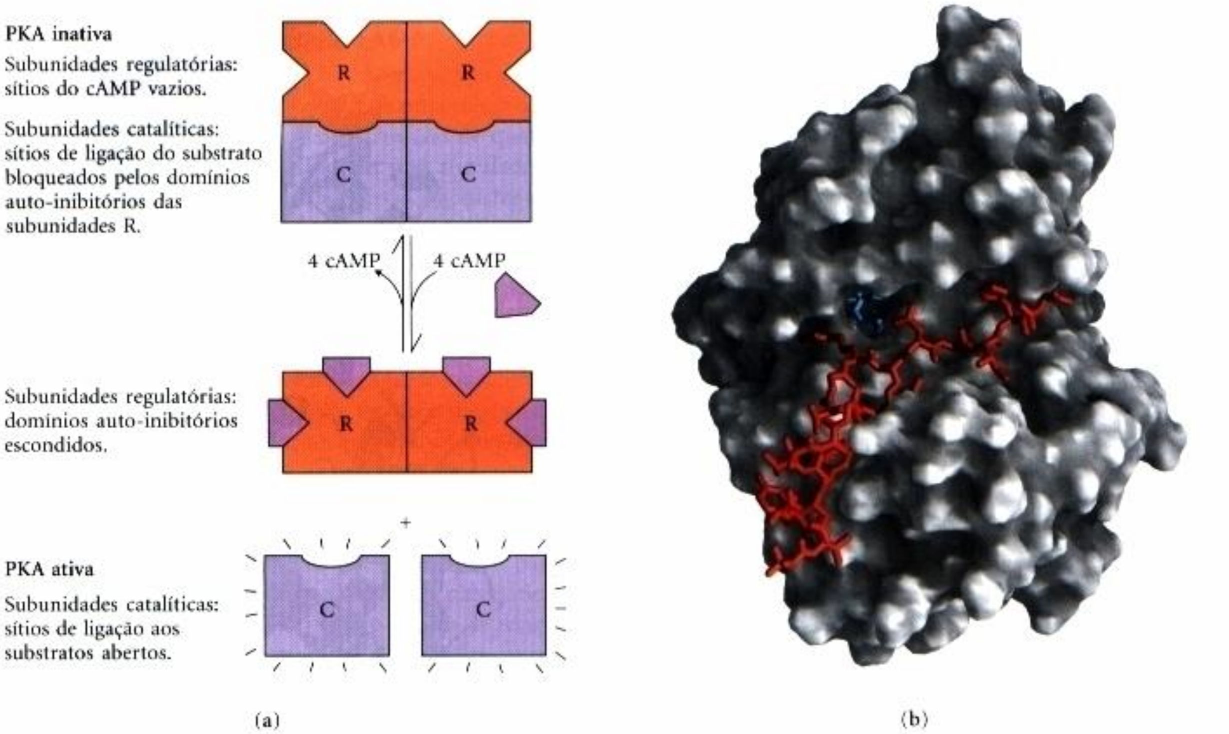

PKA inativa
Subunidades regulatórias: sítios do cAMP vazios.
Subunidades catalíticas: sítios de ligação do substrato bloqueados pelos domínios auto-inibitórios das subunidades R.
R
R
C
C
4 cAMP
4 cAMP
Subunidades regulatórias: domínios auto-inibitórios escondidos.
R
R
+
PKA ativa
Subunidades catalíticas: sítios de ligação aos substratos abertos.
C
C
(a)
(b)

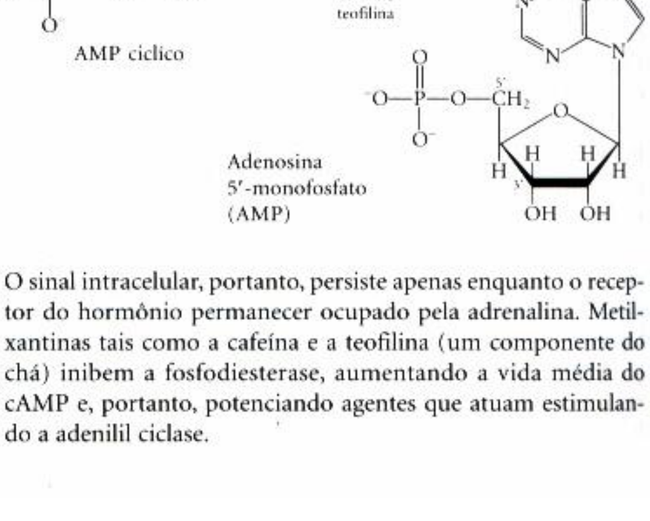
Figura 13-14 – Ativação da proteína quinase dependente de cAMP, PKA. (**a**) No tetrâmero R_2C_2 inativo, o domínio auto-inibitório de uma subunidade regulatória (R) ocupa o sítio de ligação do substrato, inibindo a atividade da subunidade catalítica (C). O AMP cíclico ativa a PKA induzindo a dissociação das subunidades C com as subunidades inibitórias R. Isso permite que a PKA fosforile uma variedade de substratos protéicos (Tabela 13-3) que contém a seqüência consenso (veja Tabela 8-9), incluindo a fosforilase *b* quinase. (**b**) Uma subunidade C da PKA. Um potente inibidor peptídico (PKI), que mimetiza os substratos normais para a fosforilação, é mostrado aqui ocupando o sítio de ligação do substrato. PKI está em vermelho e o ATP, no sítio ativo, em azul. Esse inibidor contém a seqüência Arg–Arg–Gln–Ala–Ile, que corresponde à seqüência consenso reconhecida pela PKA, exceto que o resíduo de Ser fosforilado em um substrato é substituído por um resíduo de Ala no inibidor.

liga a dois sítios em cada subunidade R, a subunidade R sofre uma mudança conformacional e o complexo R_2C_2 se dissocia produzindo duas subunidades C livres, cataliticamente ativas. Esse mesmo mecanismo básico — deslocamento de um domínio auto-inibitório — medeia a ativação alostérica de muitos tipos de proteínas quinases por seus mensageiros secundários.

A transdução de sinal pela adenilil ciclase envolve várias etapas que amplificam o sinal hormonal original (Fig. 13-15). Primeiro, a ligação de uma molécula de hormônio a um receptor ativa cataliticamente várias moléculas de G_s. Em seguida, pela ativação de uma molécula da adenilil ciclase, cada molécula ativa de $G_{s\alpha}$ estimula a síntese catalítica de muitas moléculas de cAMP. O mensageiro secundário cAMP ativa agora a PKA, que por sua vez catalisa a fosforilação de muitas moléculas da proteína-alvo (fosforilase *b* quinase). Essa quinase ativa a fosforilase *b* do glicogênio, que leva à rápida mobilização de glicose a partir do glicogênio. O efeito final da cascata é a amplificação do sinal hormonal, em várias ordens de grandeza, o que explica a concentração muito baixa da adrenalina (ou qualquer outro hormônio) requerida para a atividade hormonal.

PKA regula várias enzimas, além da fosforilase *b* quinase (Tabela 13-3). Embora as proteínas reguladas pela fosforilação dependente do cAMP possuam diversas funções, elas compartilham uma região de seqüência semelhante em volta do resíduo de Ser ou Thr que sofre fosforilação, uma seqüência que as marca para a regulação pela PKA. A comparação da seqüência de vários substratos protéicos da PKA produz a seqüência consenso — o mínimo de resíduos vizinhos específicos necessários para marcar uma Ser ou Thr para a fosforilação (veja Tabela 8-9).

O AMP cíclico, o mensageiro secundário intracelular nesse sistema, é de vida curta. Ele é rapidamente degradado pela **nucleotídeo cíclico fosfodiesterase** até 5′-AMP (Fig. 13-11, etapa ⑦), que não é ativo como mensageiro secundário:


AMP cíclico
H₂O
nucleotídeo cíclico fosfodiesterase
cafeína, teofilina
Adenosina 5′-monofosfato (AMP)

O sinal intracelular, portanto, persiste apenas enquanto o receptor do hormônio permanecer ocupado pela adrenalina. Metilxantinas tais como a cafeína e a teofilina (um componente do chá) inibem a fosfodiesterase, aumentando a vida média do cAMP e, portanto, potenciando agentes que atuam estimulando a adenilil ciclase.

Tabela 13-3 – Algumas enzimas reguladas pela fosforilação dependente de cAMP (pela PKA)

Enzima	Seqüência fosforilada*	Via
Glicogênio sintase	RASCTSSS	Síntese do glicogênio
Fosforilase *b* quinase	VEFRRLSI (subunidade α) RTKRSGSV (subunidade β)	Degradação do glicogênio
Piruvato quinase (fígado de rato)	GVLRRASVAZL	Glicólise
Complexo da piruvato desidrogenase (tipo L)	GYLRRASV	Piruvato a acetil-CoA
Lipase sensível a hormônio	PMRRSV	Mobilização triacilglicerol e oxidação dos ácidos graxos
Fosfofrutoquinase/frutose-2,6-bifosfatase	LQRRRGSSIPQ	Glicólise/gliconeogênese
Tirosina hidroxilase	FIGRRQSL	Síntese da L-DOPA, dopamina, adrenalina, noradrenalina
Histona H1	AKRKASGPPVS	Condensação do DNA
Histona H2B	KKAKASRKESYSVYVYK	Condensação do DNA
Fosfolambam cardíaco intracelular (regulador de uma bomba cardíaca)	AIRRAST	Regulação da [Ca^{2+}] intracelular
Inibidor-1 da proteína fosfatase-1	IRRRRPTP	Regulação da desfosforilação de proteínas
CREB	ILSRRPSY	Regulação da expressão gênica por cAMP
PKA (seqüência consenso)[†]	XR(R/K)X(S/T)B	

O resíduo fosforilado S ou T está mostrado em vermelho. Todos os resíduos são mostrados em suas abreviações com uma letra (veja Tabela 5-1).

[†] X é um aminoácido qualquer; B é um aminoácido hidrofóbico qualquer.

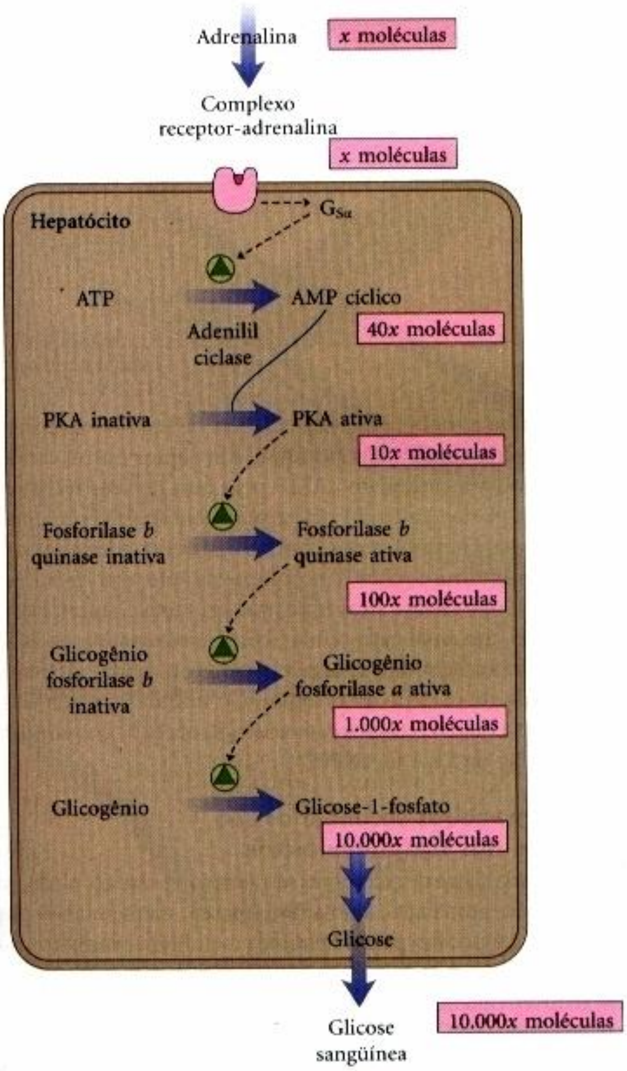


Figura 13-15 – A cascata da adrenalina. A adrenalina desencadeia uma série de reações nos hepatócitos onde catalisadores ativam catalisadores, resultando em uma grande amplificação do sinal. A ligação de um pequeno número de moléculas da adrenalina a receptores β-adrenérgicos específicos na superfície celular ativa a adenilil ciclase. Para ilustrar a amplificação, mostramos 40 moléculas de cAMP produzidas por cada molécula de adenilil ciclase, as 40 moléculas de cAMP ativam 10 moléculas de PKA, cada molécula de PKA ativa 10 moléculas da enzima seguinte, e assim por diante. Essas amplificações provavelmente estão grosseiramente subestimadas.

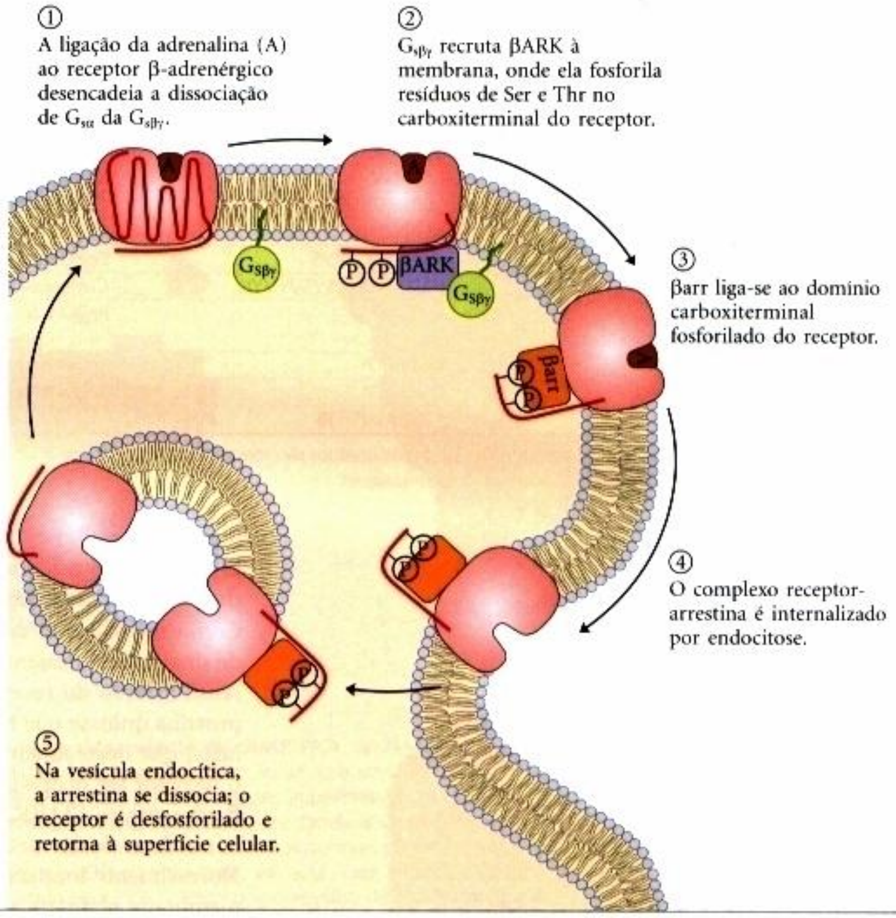
O receptor β-adrenérgico é dessensibilizado pela fosforilação

Como mencionado anteriormente, os sistemas de transdução de sinal sofrem dessensibilização quando o sinal persiste. A dessensibilização do receptor β-adrenérgico é mediada por uma proteína quinase que fosforila o receptor no domínio (intracelular) que normalmente interage com G_s (Fig. 13-16). Quando o receptor for ocupado pela adrenalina, a **quinase do receptor β-adrenérgico** (**βARK**, "β-*a*drenergic *r*eceptor *k*inase") fosforila resíduos de Ser próximos do carboxiterminal do receptor. Normalmente localizada no citosol, a βARK é puxada para a membrana plasmática por sua associação com as subunidades $G_{s\beta\gamma}$ e dessa forma é posicionada para fosforilar o receptor. A fosforilação cria um sítio de ligação para a proteína **β-arrestina**, e a ligação da arrestina efetivamente previne a interação entre o receptor e a proteína G. A ligação da arrestina também facilita o seqüestro do receptor, a remoção dos receptores da membrana plasmática por endocitose em vesículas intracelulares pequenas. Os receptores nas vesículas endocíticas são defosforilados, retornando então à membrana plasmática, completando o circuito e ressensibilizando o sistema da adrenalina. A quinase do receptor β-adrenérgico é um membro da família das **proteínas G acopladas às quinases do receptor** (**GRKs**, "*G* protein-coupled *r*eceptor *k*inases"), todas as quais fosforilam receptores serpenteantes em seu domínio carboxiterminal citosólico e desempenham funções semelhantes àquelas da βARK na dessensibilização e ressensibilização de seus receptores.

O AMP cíclico atua como um mensageiro secundário para várias moléculas regulatórias

A adrenalina é apenas um de muitos hormônios, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias que agem alterando a [cAMP] intracelular e, portanto, a atividade da PKA (Tabela 13-4). Por exemplo, o glucagon liga-se a seu receptor na membrana plasmática dos adipócitos, ativando (via uma proteína G_s) a adenilil ciclase. A PKA, estimulada pela elevação na [cAMP], fosforila e ativa a lipase do triacilglicerol, levando à mobilização dos ácidos graxos. Semelhantemente, o hormônio peptídeo ACTH (hormônio adrenocorticotrófico, também chamado de corticotrofina), produzido pela hipófise anterior, liga-se a receptores específicos no córtex adrenal, ativando a adenilil ciclase e elevando a [cAMP] intracelular. A PKA fosforila e ativa então várias das enzimas requeridas para a síntese da cortisona e outros hormônios esteróides.

Figura 13-16 – Dessensibilização do receptor β-adrenérgico na presença continuada de adrenalina. Esse processo é mediado por duas proteínas: a proteína β-adrenérgica quinase (βARK) e a β-arrestina (βarr).



① A ligação da adrenalina (A) ao receptor β-adrenérgico desencadeia a dissociação de $G_{s\alpha}$ da $G_{s\beta\gamma}$.

② $G_{s\beta\gamma}$ recruta βARK à membrana, onde ela fosforila resíduos de Ser e Thr no carboxiterminal do receptor.

③ βarr liga-se ao domínio carboxiterminal fosforilado do receptor.

④ O complexo receptor-arrestina é internalizado por endocitose.

⑤ **Na vesícula endocítica, a arrestina se dissocia; o receptor é desfosforilado e retorna à superfície celular.**

Tabela 13-4 – Alguns sinais que usam o cAMP como mensageiro secundário

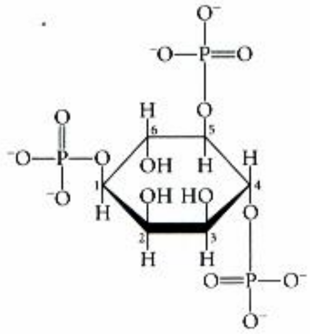
Corticotrofina (ACTH)
Hormônio liberador da corticotrofina (CRH)
Dopamina [D-1, D-2]*
Adrenalina (β-adrenérgico)
Hormônio folículo-estimulante (FSH)
Glucagon
Histamina [H-2]*
Hormônio luteinizante (LH)
Hormônio estimulante dos melanócitos (MSH)
Odorantes (muitos)
Hormônio da paratireóide
Prostaglandinas E_1, E_2 (PGE_1, PGE_2)
Serotonina [5-HT-1_α, 5-HT-2]*
Somatostatina
Gustativos (doce, amargo)
Hormônio estimulante da tireóide (TSH)

*Alguns sinais possuem dois ou mais subtipos de receptores (mostrados em colchetes), que podem possuir mecanismos de transdução diferentes. Por exemplo, a serotonina é detectada em alguns tecidos pelos subtipos de receptor 5-HT-1a e 5-HT-1b, que atuam por meio da adenilil ciclase e do cAMP, e em outros tecidos pelo subtipo de receptor 5-HT-1c, atuando por meio do mecanismo da fosfolipase C–IP_3 (veja Tabela 13-5).

Alguns hormônios atuam *inibindo* a adenilil ciclase, *diminuindo* os níveis do cAMP e *suprimindo* a fosforilação protéica. Por exemplo, a ligação da somatostatina ao seu receptor leva à ativação de uma **proteína G inibitória** ou G_i, estruturalmente homóloga à G_s, que inibe a adenilil ciclase e diminui os níveis [cAMP]. A somatostatina, portanto, contrabalanceia os efeitos do glucagon. No tecido adiposo, a prostaglandina E_1 (PGE_1, veja Fig. 11-16b) inibe a adenilil ciclase, abaixando, portanto, [cAMP] e diminuindo a mobilização das reservas de lipídios desencadeadas pela adrenalina e pelo glucagon. Em alguns outros tecidos, PGE_1 estimula a síntese do cAMP pelo fato de seus receptores estarem acoplados à adenilil ciclase por meio de uma proteína G estimulatória, G_s. Em tecidos com receptores α-adrenérgicos, a adrenalina diminui a [cAMP] porque os receptores α_2 estão acoplados a adenilil ciclase através de uma proteína G inibitória, G_i. Em resumo, um sinal extracelular, como a adrenalina ou PGE_1, pode ter efeitos bem diferentes em tecidos ou células diferentes, dependendo de (1) tipo do receptor, (2) tipo da proteína G (G_s ou G_i) com a qual o receptor estiver acoplado, e (3) conjunto das enzimas-alvo da PKA na célula.

Dois mensageiros secundários são derivados dos fosfatidilinositóis

Uma segunda classe de receptores serpenteantes está acoplada, por meio de uma proteína G, a uma **fosfolipase C** da membrana plasmática que é específica para o lipídio da membrana plasmática fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (veja Fig. 11-13). Essa enzima, hormônio-sensível, catalisa a formação de dois potentes mensageiros secundários: **diacilglicerol** e **inositol 1,4,5-trifosfato** ou **IP_3** (para não ser confundido com PIP_3 (p. 347)). Quando um hormônio dessa classe (Tabela 13-5) se liga a seu receptor específico na membrana plasmática (Fig. 13-17, etapa ①), o complexo receptor-hormônio catalisa a troca GTP-GDP em uma proteína G associada, G_q (etapa ②), ativando-a exatamente como o receptor β-adrenérgico ativa G_s (Fig. 13-11). A G_q ativada, por sua vez, ativa a fosfolipase C de membrana específica (etapa ③), que catalisa a produção dos dois mensageiros secundários pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato na membrana plasmática (etapa ④).


O⁻
⁻O—P═O
H
O
6
5
O
⁻O—P—O
OH
H
H
4
⁻O
1
OH HO
O
H
2
3
H
H
O═P—O⁻
O⁻

Inositol 1,4,5-trifosfato

Tabela 13-5 – Alguns sinais que atuam por meio da fosfolipase C e do IP_3

Acetilcolina [muscarínico M_1]
Agonistas α_1-adrenérgicos
Angiogenina
Angiotensina II
ATP [P_{2x} e P_{2y}]*
Auxina
Peptídeo liberador de gastrina
Glutamato
Hormônio liberador de gonadotrofinas (GRH)
Histamina [H_1]*
Luz (drosófila)
Ocitocina
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
Serotonina [5-HT-1c]*
Hormônio liberador de tirotrofina (TRH)
Vasopressina

* Subtipos de receptor estão entre colchetes, veja rodapé da Tabela 13-4.

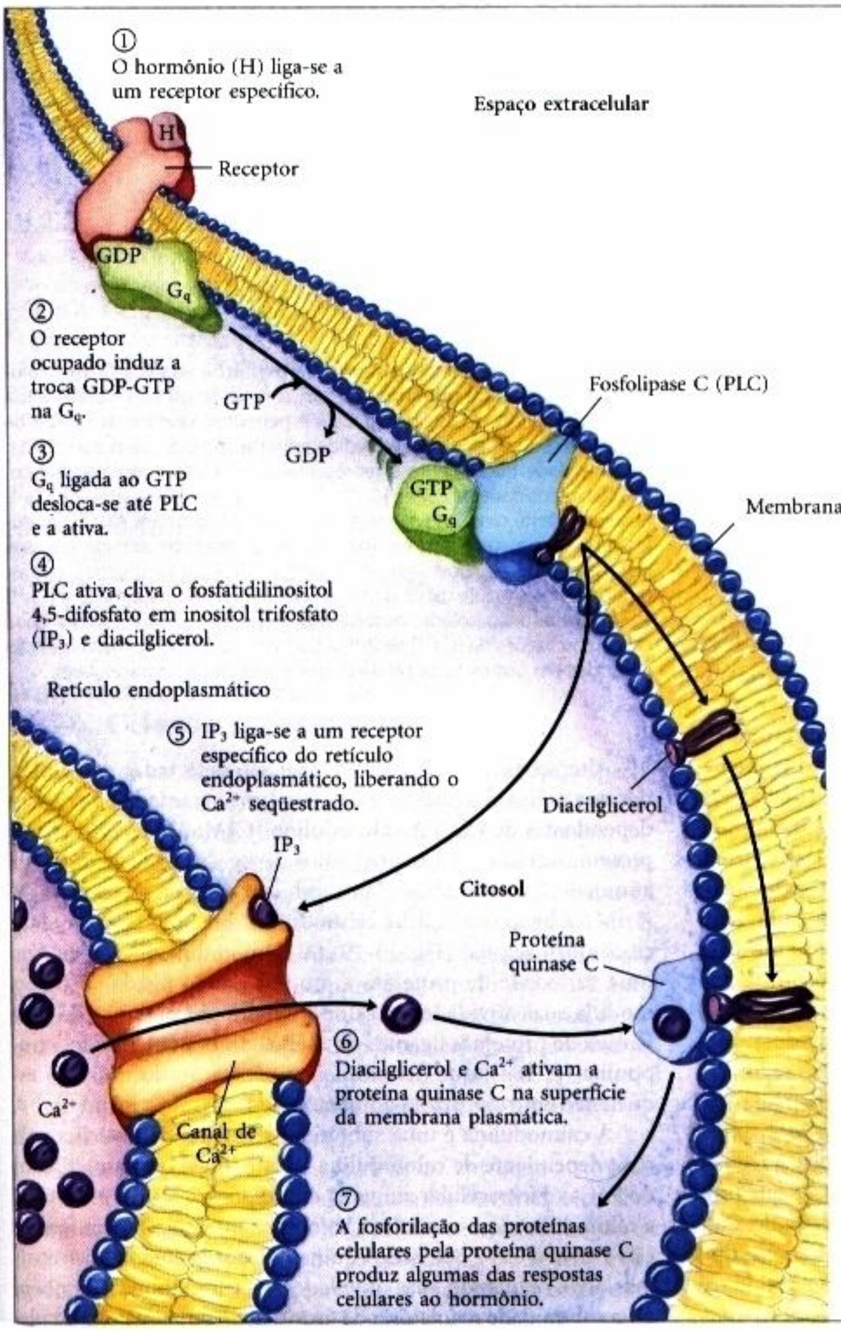
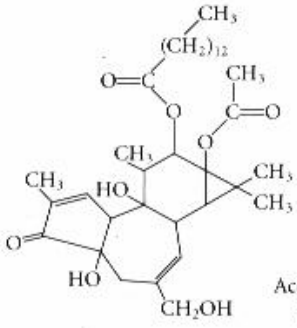

①
O hormônio (H) liga-se a um receptor específico.
Espaço extracelular
H
Receptor
GDP
Gq
②
O receptor ocupado induz a troca GDP-GTP na Gq.
GTP
GDP
③
Gq ligada ao GTP desloca-se até PLC e a ativa.
GTP
Gq
Fosfolipase C (PLC)
Membrana plasmática
④
PLC ativa cliva o fosfatidilinositol 4,5-difosfato em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol.
Retículo endoplasmático
⑤ IP₃ liga-se a um receptor específico do retículo endoplasmático, liberando o Ca²⁺ seqüestrado.
Diacilglicerol
IP₃
Citosol
Proteína quinase C
Ca²⁺
Canal de Ca²⁺
⑥
Diacilglicerol e Ca²⁺ ativam a proteína quinase C na superfície da membrana plasmática.
⑦
A fosforilação das proteínas celulares pela proteína quinase C produz algumas das respostas celulares ao hormônio.

Figura 13-17 – A fosfolipase C ativada por hormônios e o IP_3. Dois mensageiros intracelulares são produzidos no sistema da fosfatidilinositol sensível a hormônios: o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol. Ambos contribuem para a ativação da proteína quinase C. Ao elevar a [Ca^{2+}] citosólica, o IP_3 também ativa outras enzimas dependentes de Ca^{2+}; dessa forma, o Ca^{2+} também atua como mensageiro secundário.

O inositol trifosfato (IP_3), produto solúvel em água da ação da fosfolipase C, difunde-se da membrana plasmática para o retículo endoplasmático, onde se liga a receptores IP_3 específicos e induz a abertura de canais de Ca^{2+} dentro do RE. O Ca^{2+} seqüestrado é, portanto, liberado dentro do citosol (etapa ⑤). A $[Ca^{2+}]$ citosólica eleva-se rapidamente a cerca de 10^{-6}M. Um efeito da elevação da $[Ca^{2+}]$ é a ativação da **proteína quinase C (PKC)**. O diacilglicerol coopera com o Ca^{2+} na ativação da PKC e, portanto, é também um mensageiro secundário (etapa ⑥). A PKC fosforila resíduos de Ser ou Thr de proteínas-alvo específicas, alterando suas atividades catalíticas (etapa ⑦). A proteína quinase C possui várias isoenzimas, cada uma com uma distribuição tecidual característica, proteínas-alvo específicas e funções tecido-específicas.

A ação de um grupo de compostos conhecidos como **promotores de tumores** é atribuída aos seus efeitos na PKC. O mais bem conhecido dentre eles, os ésteres de forbol, são compostos sintéticos, potentes ativadores da PKC. Eles aparentemente mimetizam a ação celular do diacilglicerol como mensageiros secundários, mas, diferentemente dos diacilgliceróis de ocorrência natural, eles não são rapidamente metabolizados. Pela contínua ativação da PKC, esses promotores tumorais sintéticos interferem na regulação normal do crescimento e da divisão celulares (discutida mais adiante neste capítulo).



Acetato de miristoilforbol
(um éster de forbol)

O cálcio é um mensageiro secundário em muitas transduções de sinais

Em muitas células que respondem a sinais extracelulares, o Ca^{2+} funciona como um mensageiro secundário que desencadeia respostas intracelulares como a exocitose nos neurônios e nas células endócrinas, a contração no músculo ou os rearranjos no citoesqueleto durante o movimento amebóide. Normalmente, a $[Ca^{2+}]$ citosólica é mantida muito baixa ($<10^{-7}$M) pela ação das bombas de Ca^{2+} no RE, na mitocôndria e na membrana plasmática. Estímulos hormonais, neurais ou outros produzem ou um influxo de Ca^{2+} para dentro da célula por meio de canais de Ca^{2+} específicos na membrana plasmática ou uma liberação do Ca^{2+} seqüestrado no RE ou na mitocôndria, em ambos os casos elevando a $[Ca^{2+}]$ citosólica e desencadeando uma resposta celular.

Muito comumente, a $[Ca^{2+}]$ não aumenta e depois decai simplesmente, mas sim oscila com um período de alguns segundos (Fig. 13-18), mesmo quando a concentração extracelular do hormônio permanece constante. O mecanismo que está subjacente às oscilações da $[Ca^{2+}]$ presumivelmente envolve a regulação por retroalimentação do Ca^{2+} tanto da fosfolipase que produz IP_3 quanto do canal iônico que regula a liberação do Ca^{2+} do RE. Qualquer que seja o mecanismo, o efeito é que um tipo de sinal (concentração hormonal, por exemplo) é convertido em outro (freqüência e amplitude dos picos da $[Ca^{2+}]$).

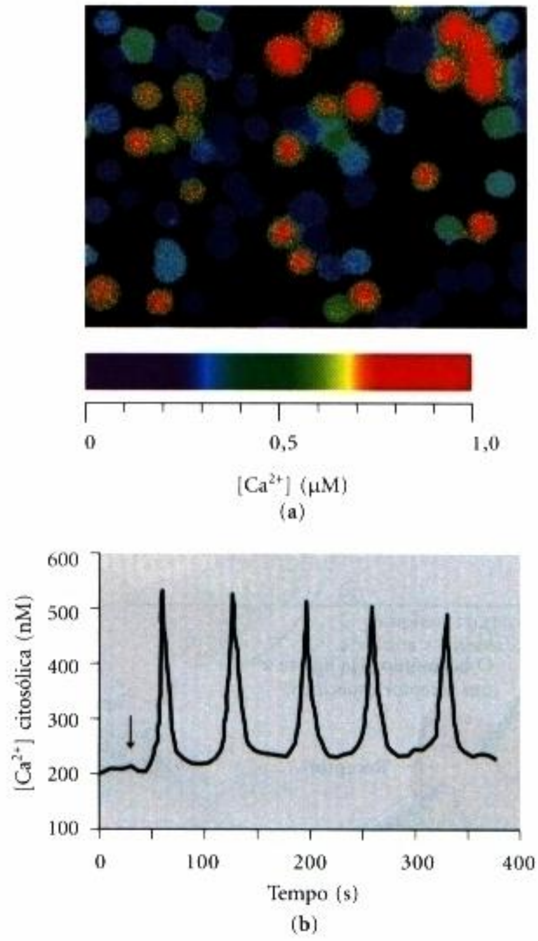


Figura 13-18 – Desencadeamento de oscilações na $[Ca^{2+}]$ intracelular por sinais extracelulares. (**a**) Um corante (fura) cuja fluorescência se altera quando ele se liga ao Ca^{2+} é permitido se difundir dentro da célula e sua emissão de luz é medida pelo microscópio de fluorescência. A intensidade fluorescente é representada em cores, a escala de cores relata a intensidade da cor ao $[Ca^{2+}]$, permitindo a determinação da $[Ca^{2+}]$ absoluta. Neste caso, os timócitos foram estimulados com ATP extracelular, que eleva a sua $[Ca^{2+}]$ interna. As células são heterogêneas em suas respostas; algumas possuem alta $[Ca^{2+}]$ intracelular (vermelho), outras, muito menores (azul). (**b**) Quando tal sonda foi usada para medir a $[Ca^{2+}]$ em um hepatócito isolado, observamos que o antagonista noradrenalina causou oscilações da $[Ca^{2+}]$ de 200 a 500nM. Oscilações semelhantes são induzidas em outros tipos celulares por outros sinais extracelulares.

Alterações na $[Ca^{2+}]$ intracelular são detectadas por proteínas que se ligam ao cálcio e regulam uma variedade de enzimas dependentes de Ca^{2+}. A **calmodulina (CaM;** M_r **17.000)** é uma proteína acídica com quatro sítios de ligação ao cálcio de alta afinidade. Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular se eleva a cerca de 10^{-6}M (1µM), a ligação do Ca^{2+} à calmodulina direciona uma mudança conformacional (Fig. 13-19). A calmodulina associa-se com uma variedade de proteínas e, no seu estado ligada ao cálcio, modula suas atividades. A calmodulina é um membro de uma família de proteínas ligantes do cálcio, também incluindo a troponina (p. 184), que desencadeia a contração do músculo esquelético em resposta ao aumento da $[Ca^{2+}]$.

A calmodulina é uma subunidade integral da **proteína quinase dependente de calmodulina e Ca^{2+} (CaM quinase)**. Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta em resposta a alguns estímulos, a calmodulina liga-se ao Ca^{2+}, sofre uma mudança na conformação e ativa a CaM quinase. A quinase fosforila então várias enzimas-alvo, regulando suas atividades. A calmodulina é também uma subunidade regulatória da fosforilase *b* quinase do músculo,

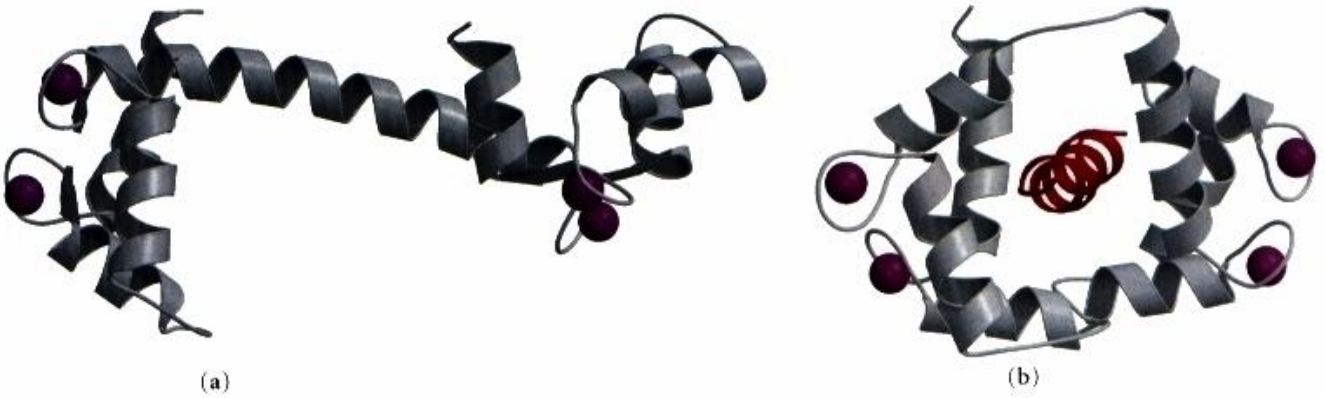


Figura 13-19 – Calmodulina. A calmodulina, proteína mediadora de muitas reações enzimáticas estimuladas por Ca^{2+}, possui quatro sítios de ligação de alta afinidade para o Ca^{2+} (K_d de cerca de 0,1 a 1μM). (**a**) Um modelo de fita da estrutura cristalina da calmodulina, determinada por cristalografia de raios X. Os quatro sítios de ligação são ocupados pelo Ca^{2+} (púrpura). O domínio aminoterminal está à esquerda, o domínio carboxiterminal, à direita. (**b**) A calmodulina associada com um domínio helicoidal (vermelho) de uma das muitas enzimas que ela regula, a proteína quinase II dependente de calmodulina. Note que a longa α-hélice central visível em (**a**) curvou-se sobre si mesma ao se ligar ao domínio helicoidal do substrato.

que é ativada por Ca^{2+}. Dessa forma, o Ca^{2+} desencadeia as contrações musculares que requerem ATP, enquanto também ativa a degradação do glicogênio, fornecendo combustível para a síntese do ATP. Muitas outras enzimas são também conhecidas como moduladas por Ca^{2+} por meio da calmodulina (Tabela 13-6).

Tabela 13-6 – Algumas proteínas reguladas por Ca^{2+} e calmodulina

Adenilil ciclase (cérebro)
Proteínas quinases dependentes de Ca^{2+}/calmodulina
Canal de Na^+ dependente de Ca^{2+} (*Paramecium*)
Canal do retículo endoplasmático liberador de Ca^{2+}
Calcineurina (fosfoproteína fosfatase 2B)
Fosfodiesterase do cAMP
Canal olfativo dependente de cAMP
Canais de Na^+Ca^{2+} abertos por cAMP (células dos bastonetes e cones)
Quinases da cadeia leve da miosina
NADH quinase
Sintase do óxido nítrico
PI-3 quinase
ATPase Ca^{2+} da membrana plasmática (bomba de Ca^{2+})
RNA helicase (p68)

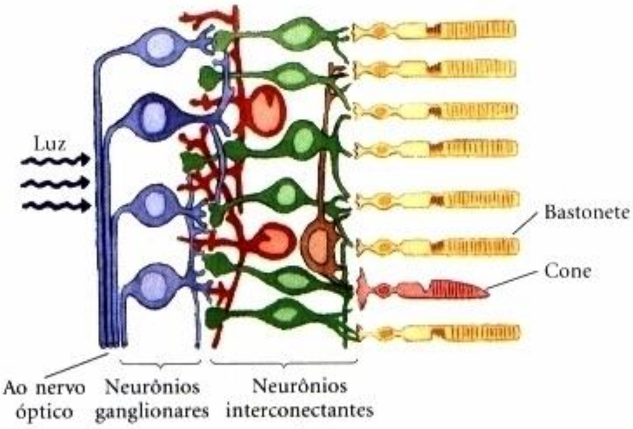


Figura 13-20 – A recepção da luz nos olhos dos vertebrados. O cristalino dos olhos focaliza a luz na retina, que é composta de camadas de neurônios. Os neurônios fotorreceptores primários são as células bastonetes (laranja), que são responsáveis pela alta resolução e pela visão noturna, e as células cones de três subtipos (vermelho) que iniciam a visão colorida. Os bastonetes e os cones formam sinapses com várias camadas de neurônios interconectantes que conduzem e integram os sinais elétricos. Os sinais finalmente passam dos neurônios ganglionares, pelo nervo óptico, até o cérebro.

Transdução Sensorial na Visão, Olfação e Gustação

A detecção de luz, cheiro e gosto (visão, olfato e gustação, respectivamente) nos animais é realizada por neurônios sensoriais especializados que usam mecanismos de transdução de sinal fundamentalmente semelhantes àqueles usados para detectar hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento. Um sinal sensorial inicial é amplificado grandemente pelos mecanismos que envolvem canais iônicos e mensageiros secundários intracelulares; o sistema adapta-se à estimulação contínua, alterando sua sensibilidade ao estímulo (dessensibilização), e a mensagem sensorial de vários receptores é integrada antes de o sinal final chegar ao cérebro.

A luz hiperpolariza as células bastonetes e cones dos olhos dos vertebrados

Nos olhos dos vertebrados, um feixe de luz entrando através da pupila é focado numa coleção de neurônios sensíveis à luz altamente organizados (Fig. 13-20). As células sensíveis à luz são de dois tipos: **bastonetes** (cerca de 10^9 por retina), que sensoriam níveis baixos de luz mas não conseguem discriminar cores, e **cones** (cerca de 3×10^6 por retina), que são menos sensíveis mas conseguem discriminar as cores. Ambos os tipos de células são neurônios sensoriais especializados longos e estreitos, com dois compartimentos celulares distintos: um **segmento externo**, que contém dúzias de discos membranosos carregados com a proteína de membrana, a rodopsina, e um **segmento interno**, contendo o núcleo e muitas mitocôndrias que produzem o ATP essencial para a fototransdução.

Da mesma forma que os outros neurônios, os bastonetes e os cones possuem um potencial elétrico transmembrana (V_m), produzido pela bomba eletrogênica da ATPase Na^+K^+ na membrana plasmática do segmento interno (Fig. 13-21). Contribuindo também para o potencial de membrana está um canal iônico, que permite a passagem quer do Na^+ quer do Ca^{2+} e é aberto pelo cGMP. No escuro, os bastonetes contêm cGMP suficiente para manter esse canal aberto. O potencial de membrana é, portanto, determinado pela diferença entre o Na^+ e o K^+ bombeados pelo segmento interno (que polariza a membrana) e o influxo de Na^+ por meio dos canais iônicos do segmento externo (que tendem a despolarizar a membrana).

A essência da sinalização nos bastonetes e cones da retina é a diminuição na concentração do cGMP induzida pela luz, que faz com que o canal iônico aberto por cGMP se feche. A membrana plasmática, então, torna-se hiperpolarizada pela ATPase Na^+K^+. As células bastonetes e cones fazem sinapse com neurônios interconectantes (Fig. 13-20) que transportam a informação sobre a atividade elétrica aos neurônios ganglionares próximos da superfície interna da retina. Os neurônios ganglionares integram os estímulos de muitas células bastonetes e cones e enviam o sinal resultante através do nervo óptico ao córtex visual do cérebro.

A luz desencadeia mudanças conformacionais no receptor rodopsina

A transdução visual começa quando a luz incide em muitos milhares de moléculas de rodopsina que estão presentes em cada um dos discos do segmento externo. A **rodopsina** (M_r 40.000) é uma proteína integral com sete α-hélices que atravessam a membrana (Fig. 13-22), a arquitetura serpenteante característica. O domínio aminoterminal projeta-se dentro do disco e o domínio carboxiterminal está voltado para o citosol do segmento externo.

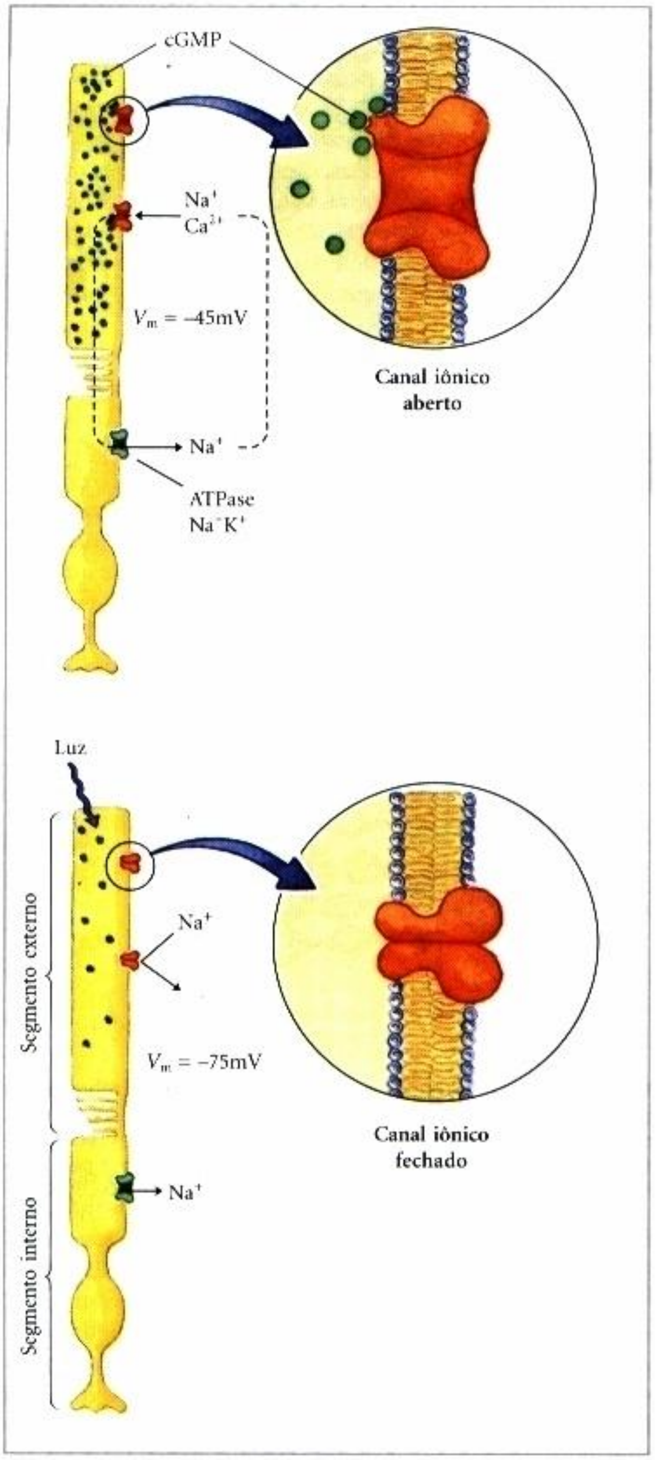


Figura 13-21 – Hiperpolarização das células bastonetes induzida pela luz. A célula bastonete consiste de um segmento externo, preenchido com pilhas de discos membranosos (não mostradas) contendo o fotorreceptor rodopsina, e um segmento interno que contém o núcleo e outras organelas. Os cones possuem uma estrutura semelhante. O ATP no segmento interno fornece energia para a ATPase Na^+K^+, que cria um potencial elétrico transmembrana bombeando 3 Na^+ para fora por cada 2 K^+ bombeados para dentro. O potencial da membrana é reduzido pelo fluxo de Na^+ e de Ca^{2+} de volta para a célula através dos canais catiônicos abertos por cGMP na membrana plasmática do segmento externo. Quando a rodopsina absorve a luz, ela desencadeia a degradação do cGMP (pontos verdes) no segmento externo, causando o fechamento do canal de cátions. Sem o influxo do cátion através desse canal, a célula torna-se hiperpolarizada. Esse sinal elétrico é passado ao cérebro através das camadas de neurônios mostradas na Figura 13-20.

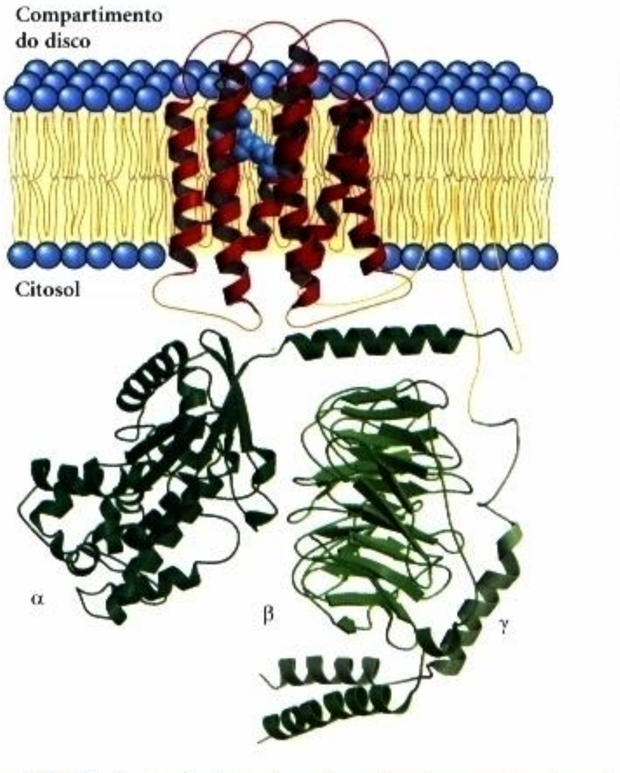


Figura 13-22 – A provável estrutura da rodopsina complexada com a proteína G transducina. A rodopsina (vermelho) possui sete hélices transmembrana incrustadas nas membranas dos discos do segmento externo e está orientada com a sua extremidade carboxiterminal no lado citosólico, sua extremidade aminoterminal está dentro do disco. O cromóforo 11-*cis*-retinal (azul), preso por meio de uma base de Schiff ligada à Lys^{256} da sétima hélice, coloca-se próximo ao centro da bicamada. (Essa localização é semelhante àquela do sítio de ligação da adrenalina no receptor β-adrenérgico.) Vários resíduos de Ser e Thr próximos da extremidade carboxiterminal são substratos para as fosforilações que são parte do mecanismo de dessensibilização para a rodopsina. Alças citosólicas que interagem com a proteína G transducina estão mostradas em cor laranja; suas posições exatas não são ainda conhecidas. As três subunidades da transducina (verde) estão mostradas em seu arranjo provável. A rodopsina liga-se ao ácido palmítico em sua extremidade carboxiterminal, e ambas as subunidades α e β da transducina possuem lipídios que ajudam a ancorá-la na membrana; essas caudas hidrofóbicas estão em amarelo.

O pigmento que absorve a luz (cromóforo) **11-*cis*-retinal** é covalentemente ligado à **opsina**, o componente protéico da rodopsina, por meio de uma base de Schiff com um resíduo de Lys. O retinal está situado no meio da bicamada (Fig. 13-22), orientando-se com seu longo eixo aproximadamente no plano da membrana. Quando um fóton é absorvido pelo componente retinal da rodopsina, a energia produz uma alteração fotoquímica, e o 11-*cis*-retinal é convertido em **todo-*trans*-retinal** (veja Figs. 3-8b e 11-19). Essa alteração na estrutura do cromóforo produz uma mudança conformacional na molécula da rodopsina — a primeira etapa na transdução visual.

A rodopsina excitada atua por meio da proteína G transducina para reduzir a concentração do cGMP

Na sua conformação excitada, a rodopsina é capaz de interagir com uma segunda proteína, a **transducina**, que flutua próximo à face citosólica da membrana do disco (Fig. 13-22). A transducina (T) pertence à mesma família das proteínas triméricas que ligam GTP, como as G_s e G_i. Embora especializadas na transdução visual, a transducina compartilha muitas características funcionais com G_s e G_i. Ela pode ligar-se tanto ao GDP quanto ao GTP. No escuro, o GDP está ligado, todas as três subunidades da proteína (T_α, T_β e T_γ) permanecem juntas e nenhum sinal é enviado. Quando a rodopsina é excitada pela luz, ela interage com a transducina, catalisando a substituição do GDP ligado pelo GTP a partir do citosol (Fig. 13-23, etapas ① e ②). A transducina, então, dissocia-se em T_α e $T_{\beta\gamma}$, e o GTP ligado a T_α transporta o sinal do receptor excitado ao próximo elemento da via da transdução, a cGMP fosfodiesterase (PDE), uma enzima que converte cGMP em 5'-GMP (etapas ③ e ④). Observe que esta não é a mesma nucleotídeo cíclico fosfodiesterase que hidrolisa o cAMP para encerrar a resposta β-adrenérgica. A PDE específica para o cGMP é exclusiva das células visuais da retina.

PDE é uma proteína integral com seu sítio ativo no lado citosólico da membrana do disco. No escuro, uma subunidade inibitória fortemente ligada suprime efetivamente a atividade PDE.

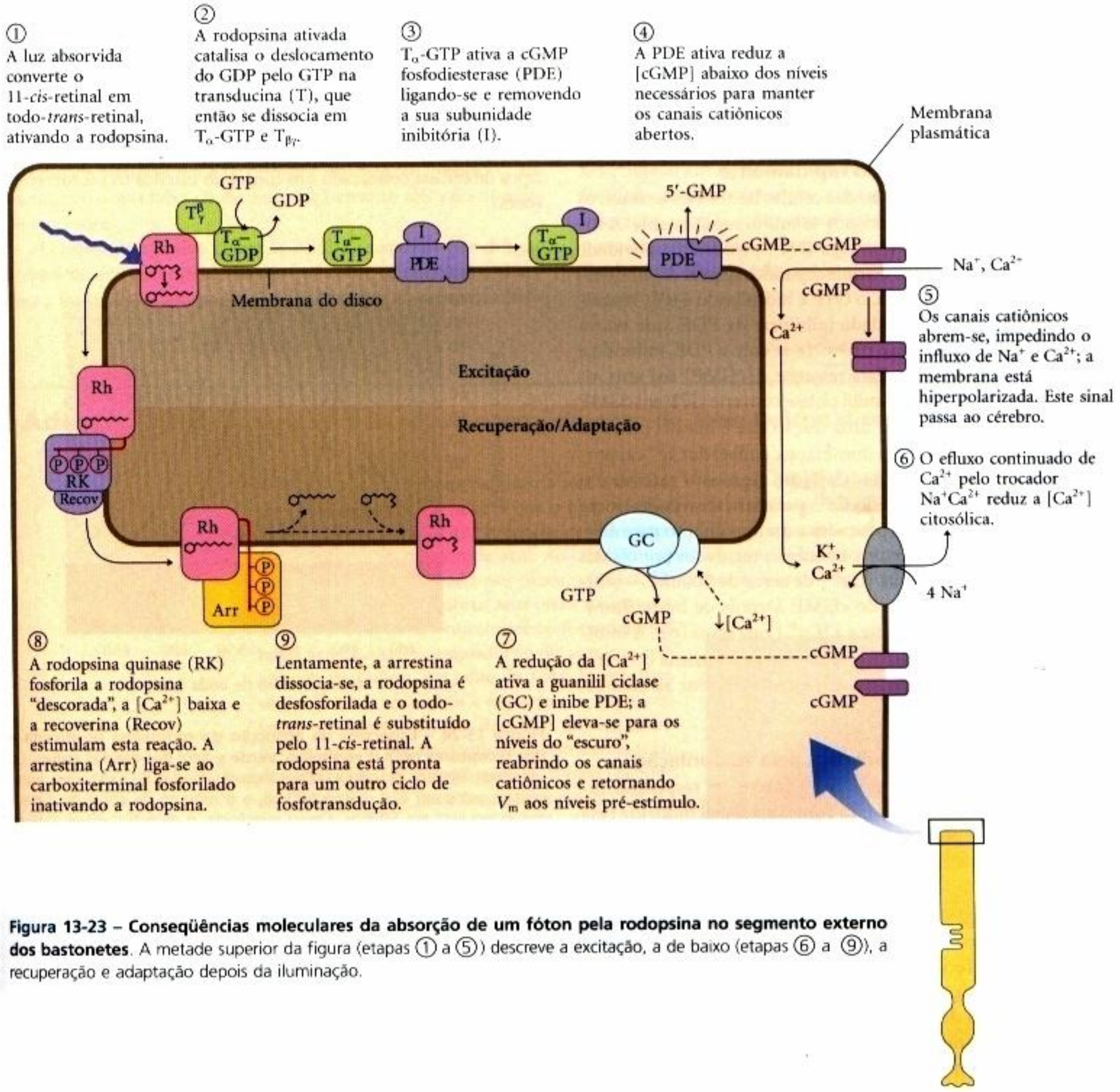

① A luz absorvida converte o 11-*cis*-retinal em todo-*trans*-retinal, ativando a rodopsina.
② A rodopsina ativada catalisa o deslocamento do GDP pelo GTP na transducina (T), que então se dissocia em T_α-GTP e $T_{\beta\gamma}$.
③ T_α-GTP ativa a cGMP fosfodiesterase (PDE) ligando-se e removendo a sua subunidade inibitória (I).
④ A PDE ativa reduz a [cGMP] abaixo dos níveis necessários para manter os canais catiônicos abertos.
Membrana plasmática
GTP
GDP
T^β_γ
T_α–GDP
T_α–GTP
I
PDE
T_α–GTP
I
5'-GMP
PDE
cGMP
cGMP
Na^+, Ca^{2+}
Rh
Membrana do disco
cGMP
Ca^{2+}
⑤ Os canais catiônicos abrem-se, impedindo o influxo de Na^+ e Ca^{2+}; a membrana está hiperpolarizada. Este sinal passa ao cérebro.
Excitação
Rh
Recuperação/Adaptação
⑥ O efluxo continuado de Ca^{2+} pelo trocador Na^+Ca^{2+} reduz a $[Ca^{2+}]$ citosólica.
P P P
RK
Recov
Rh
Rh
GC
K^+, Ca^{2+}
P
P
Arr P
GTP
4 Na^+
cGMP
↓$[Ca^{2+}]$
⑧ A rodopsina quinase (RK) fosforila a rodopsina "descorada", a $[Ca^{2+}]$ baixa e a recoverina (Recov) estimulam esta reação. A arrestina (Arr) liga-se ao carboxiterminal fosforilado inativando a rodopsina.
⑨ Lentamente, a arrestina dissocia-se, a rodopsina é desfosforilada e o todo-*trans*-retinal é substituído pelo 11-*cis*-retinal. A rodopsina está pronta para um outro ciclo de fosfotransdução.
⑦ A redução da $[Ca^{2+}]$ ativa a guanilil ciclase (GC) e inibe PDE; a [cGMP] eleva-se para os níveis do "escuro", reabrindo os canais catiônicos e retornando V_m aos níveis pré-estímulo.
cGMP
cGMP

Figura 13-23 – Conseqüências moleculares da absorção de um fóton pela rodopsina no segmento externo dos bastonetes. A metade superior da figura (etapas ① a ⑤) descreve a excitação, a de baixo (etapas ⑥ a ⑨), a recuperação e adaptação depois da iluminação.

Quando T_α-GTP encontra a PDE, a subunidade inibitória é liberada e a atividade enzimática imediatamente aumenta várias ordens de grandeza. Cada molécula de PDE ativa degrada muitas moléculas de cGMP ao biologicamente inativo 5'-GMP, diminuindo a [cGMP] no segmento externo em uma fração de segundo. No novo e baixo nível da [cGMP], os canais iônicos regulados por cGMP se fecham, bloqueando a reentrada de Na^+ e Ca^{2+} dentro do segmento externo e hiperpolarizando a membrana das células dos bastonetes e cones (etapa ⑤). Por esse processo, o estímulo inicial — um fóton — altera a V_m da célula.

A amplificação de sinal ocorre nas células bastonetes e cones

Várias etapas no processo de transdução visual resultam em grande amplificação do sinal. Cada molécula de rodopsina excitada ativa pelo menos 500 moléculas de transducina, cada uma das quais ativa uma molécula de PDE. A PDE possui um número de renovação marcantemente elevado, cada molécula ativada hidrolisa 4.200 moléculas do cGMP por segundo. A ligação do cGMP aos canais iônicos regulados por cGMP é cooperativa (pelo menos três moléculas devem estar ligadas para abrir um canal), e uma alteração relativamente pequena na [cGMP] registra, portanto, uma grande alteração na condutância iônica. O resultado dessas amplificações é uma sensibilidade delicada à luz. A absorção de um único fóton fecha um milhar ou mais de canais iônicos e altera o potencial de membrana da célula em cerca de 1mV.

O sinal visual é terminado rapidamente

Depois que cessa a iluminação das células bastonetes e cones, os sistemas fotossensoriais desativam-se muito rapidamente. A subunidade da transducina (que liga GTP) possui uma atividade GTPase intrínseca. Dentro de milissegundos depois da diminuição da intensidade luminosa, o GTP é hidrolisado e a T_α reassocia-se com a $T_{\beta\gamma}$. A subunidade inibitória da PDE, que estava ligada à T_α-GTP, é liberada e reassocia-se com a PDE, inibindo a enzima muito fortemente. Para retornar a [cGMP] aos seus níveis "do escuro", a enzima guanilil ciclase converte GTP em cGMP (etapa ⑦ na Fig. 13-23) em uma reação que é inibida pela alta $[Ca^{2+}]$ (>100nM). Durante a iluminação, o nível de Ca^{2+} cai porque o estado de equilíbrio da $[Ca^{2+}]$ no segmento externo é o resultado do bombeamento do Ca^{2+} para fora através do trocador Na^+Ca^{2+} da membrana plasmática e o movimento para dentro do Ca^{2+} através da abertura dos canais regulados por cGMP. No escuro, isso produz uma $[Ca^{2+}]$ de cerca de 500nM — suficiente para inibir a síntese do cGMP. Depois de breve iluminação, o Ca^{2+} entra lentamente e a $[Ca^{2+}]$ cai (etapa ⑥). A inibição da guanilil ciclase pelo Ca^{2+} é aliviada e a enzima converte GTP em cGMP para retornar a seu estado anterior ao estímulo (etapa ⑦).

A rodopsina é dessensibilizada pela fosforilação

A própria rodopsina também sofre alterações em resposta à iluminação prolongada. A mudança conformacional induzida pela absorção da luz expõe vários resíduos de Thr e Ser no domínio carboxiterminal. Esses resíduos são rapidamente fosforilados pela **rodopsina quinase** (etapa ⑧ na Fig. 13-23) que é funcional e estruturalmente homóloga à quinase β-adrenérgica (βARK) que dessensibiliza o receptor β-adrenérgico (Fig. 13-16). A proteína ligante de Ca^{2+}, a **recoverina,** inibe a rodopsina quinase em altas $[Ca^{2+}]$, mas a inibição é aliviada quando a $[Ca^{2+}]$ cai depois da iluminação, como descrito anteriormente. O domínio carboxiterminal da rodopsina fosforilada é ligado pela proteína **arrestina,** prevenindo a interação entre a rodopsina ativada e a transducina. A arrestina é um homólogo próximo da β-arrestina (Fig. 13-16). Em uma escala de tempo relativamente longa (segundos a minutos), o todo-*trans*-retinal de uma molécula de rodopsina ativada é removido e substituído por 11-*cis*-retinal, produzindo rodopsina que está pronta para um outro ciclo de excitação (etapa ⑨ na Fig. 13-23).

Os humanos não conseguem sintetizar retinal a partir de precursores mais simples e precisam obtê-lo na dieta na forma de vitamina A (pág. 293). Dado o papel do retinal no processo da visão, não é surpreendente que a deficiência dietética da vitamina A produza a cegueira noturna (visão pobre à noite ou em luz fraca).

As células cones se especializaram na visão colorida

A visão colorida nas células cones envolve uma via de transdução sensorial essencialmente idêntica, desencadeada por receptores de luz levemente diferentes. Três tipos de células cones são especializados em detectar a luz de diferentes regiões do espectro, usando três proteínas fotorreceptoras relacionadas (opsinas). Cada célula cone expressa apenas um tipo de opsina, mas cada tipo é muito relacionado à rodopsina em tamanho, seqüência de aminoácidos e presumivelmente estrutura tridimensional. As diferenças entre as opsinas são, entretanto, suficientemente grandes para colocar o cromóforo 11-*cis*-retinal em três ambientes levemente diferentes, resultando que os três fotorreceptores possuam diferentes espectros de absorção (Fig. 13-24). Nós discriminamos cores e nuâncias integrando os sinais vindos dos três tipos de células cone, cada um contendo um dos três fotorreceptores.

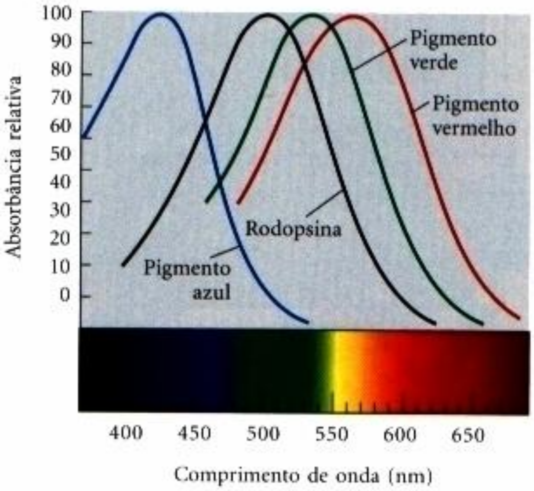


Figura 13-24 – Espectros de absorção da rodopsina purificada e dos receptores para o vermelho, verde e azul das células cones. Os espectros, obtidos de células cones individualizadas de cadáveres, apresentam picos em 420, 530 e 560nm, e o máximo de absorção para a rodopsina está em 500nm. Como referência, o espectro visível para os humanos está entre 380 e 750nm.

A cegueira às cores, tal como a inabilidade para distinguir o vermelho do verde, é um traço geneticamente herdado muito comum nos humanos. Os vários tipos de cegueira às cores resultam de diferentes mutações na opsina. Uma forma é devida à perda do fotorreceptor vermelho, os indivíduos afetados são chamados de **dicromatas para o vermelho** (vêem apenas duas cores primárias). Outros não possuem o pigmento verde e são

dicromatas para o verde$^-$. Em alguns casos, os fotorreceptores vermelho e verde estão presentes mas possuem uma alteração na seqüência de aminoácidos que produz uma mudança em seus espectros de absorção, resultando em uma visão colorida anormal. Dependendo de qual pigmento estiver alterado, tais indivíduos são chamados de **tricromatas anômalos para o vermelho** ou **tricromatas anômalos para o verde**. O exame dos genes para os receptores visuais permitiu recentemente o diagnóstico da cegueira às cores em um famoso "paciente", mais de um século após sua morte (Adendo 13-2).

A olfação e a gustação dos vertebrados usam mecanismos semelhantes ao sistema visual

As células sensoriais usadas para detectar os odores e os sabores têm muito em comum com as células bastonetes e cones que detectam a luz. Os neurônios olfativos possuem vários cílios longos e finos que se estendem de uma extremidade da célula para dentro da camada mucosa que cobre a célula. Esses cílios apresentam uma área de grande superfície para a interação com os sinais olfativos. Os receptores para o estímulo olfativo são proteínas da membrana ciliar com a estrutura serpenteante familiar das setes α-hélices transmembrana. O sinal olfativo pode ser qualquer um de grande número de compostos voláteis para os quais há proteínas receptoras específicas. Nossa habilidade de discriminar odores origina-se de centenas de receptores olfativos diferentes na língua e na passagem nasal e da habilidade do cérebro em integrar os impulsos vindos dos diferentes tipos de receptores olfativos para reconhecer um padrão "híbrido", aumentando nossa faixa de discriminação muito além do número de receptores.

O estímulo olfativo chega às células sensoriais por difusão através do ar. Na camada mucosa que cobre os neurônios olfativos, a molécula odorante liga-se diretamente ao receptor olfativo ou a uma proteína de ligação específica que transporta o odorante até o receptor (Fig. 13-25). A interação entre o odorante e o receptor desencadeia uma mudança na conformação do receptor que leva à substituição do GDP ligado por um GTP em uma proteína G_{olf}, análoga à transducina e à G_s do sistema β-adrenérgico. A G_{olf} ativa então a adenilil ciclase da membrana ciliar, que sintetiza cAMP a partir do ATP, elevando a [cAMP] local. Os canais de Na^+ regulados por cAMP da membrana ciliar se abrem, e o influxo de Na^+ produz uma pequena despolarização chamada de **potencial do receptor**. Se um número suficiente de moléculas encontrar os receptores, o potencial do receptor será suficientemente forte para induzir o neurônio a disparar um potencial de ação. Isso é transmitido ao cérebro em várias etapas e é registrado como um odor específico. Todos esses eventos ocorrem dentro de 100 a 200 milissegundos.

Alguns neurônios olfativos usam um segundo mecanismo de transdução. Eles possuem receptores acoplados por meio de proteínas G à fosfolipase C em vez da adenilil ciclase. A recepção de sinais nessas células desencadeia a produção de IP_3 (Fig. 13-17), que abre os canais de Ca^{2+} regulados por IP_3 na membrana ciliar. O influxo do Ca^{2+} despolariza então a membrana ciliar e gera um potencial do receptor ou regula enzimas dependentes de Ca^{2+} na via olfativa.

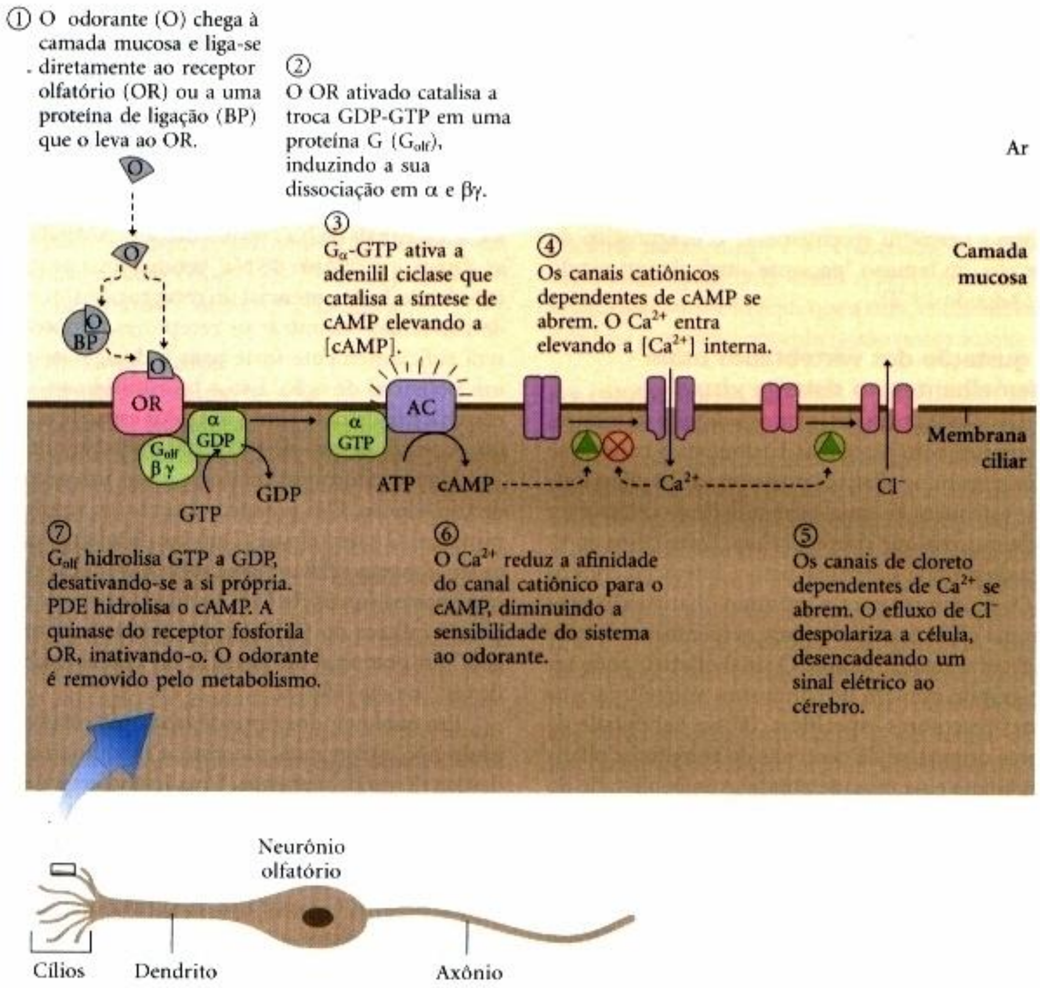
Em qualquer dos tipos de neurônio olfativo, quando o estímulo não estiver mais presente, a maquinaria de transdução se desliga de várias maneiras. Uma fosfodiesterase do cAMP retorna a [cAMP] no nível do pré-estímulo. A G_{olf} hidrolisa o seu GTP ligado em GDP, inativando-se dessa forma a si própria. A fosforilação do receptor por uma quinase específica previne sua interação com G_{olf} por um mecanismo análogo àquele usado para dessensibilizar o receptor β-adrenérgico e a rodopsina. E, finalmente, alguns odorantes são enzimaticamente destruídos por oxidases.

Adendo 13-2

Cegueira às cores: o experimento de John Dalton direto do túmulo

O químico John Dalton (da famosa teoria do átomo) era cego à cor. Ele achava que o humor vítreo de seus olhos (o fluido que preenche os olhos atrás do cristalino) era tingido de azul. Ao contrário do fluido incolor encontrado nos olhos normais. Ele propôs que, após sua morte, seus olhos fossem dissecados e a cor de seu humor vítreo fosse determinada. Seu desejo foi cumprido, no dia seguinte após a morte de Dalton, em julho de 1844, Joseph Ransome dissecou seus olhos e encontrou o humor vítreo perfeitamente incolor. Ransome, da mesma forma que muitos outros cientistas, estava relutante em descartar aquela peça anatômica. Ele colocou os olhos de Dalton em um jarro com preservativo (Fig. 1), onde eles permaneceram até o meio da década de 1990, quando biologistas moleculares da Inglaterra retiraram pequenas amostras dessas retinas de 150 anos e extraíram o DNA. Usando as seqüências de genes conhecidas para as opsinas dos fotopigmentos vermelho e verde, eles amplificaram as seqüências relevantes (usando técnicas descritas no Capítulo 29) e determinaram que Dalton tinha o gene da opsina para o fotopigmento vermelho mas não possuía o gene da opsina para o fotopigmento verde. Dalton era um dicromata verde$^-$. Cento e cinqüenta anos após sua morte, o experimento que ele iniciou — hipotetizando sobre a causa da sua cegueira à cor — foi finalmente terminado.

Figura 1 – Os olhos de Dalton. Retirado de Hunt DM, Dulai KS, Bowmaker JK, Mollon JD. (1995) The chemistry of John Dalton's color blindness. *Science* **267**, 984-988.



① O odorante (O) chega à camada mucosa e liga-se diretamente ao receptor olfatório (OR) ou a uma proteína de ligação (BP) que o leva ao OR.

② O OR ativado catalisa a troca GDP-GTP em uma proteína G (G_{olf}), induzindo a sua dissociação em α e βγ.

③ G_α-GTP ativa a adenilil ciclase que catalisa a síntese de cAMP elevando a [cAMP].

④ Os canais catiônicos dependentes de cAMP se abrem. O Ca^{2+} entra elevando a $[Ca^{2+}]$ interna.

⑤ Os canais de cloreto dependentes de Ca^{2+} se abrem. O efluxo de Cl^- despolariza a célula, desencadeando um sinal elétrico ao cérebro.

⑥ O Ca^{2+} reduz a afinidade do canal catiônico para o cAMP, diminuindo a sensibilidade do sistema ao odorante.

⑦ G_{olf} hidrolisa GTP a GDP, desativando-se a si própria. PDE hidrolisa o cAMP. A quinase do receptor fosforila OR, inativando-o. O odorante é removido pelo metabolismo.

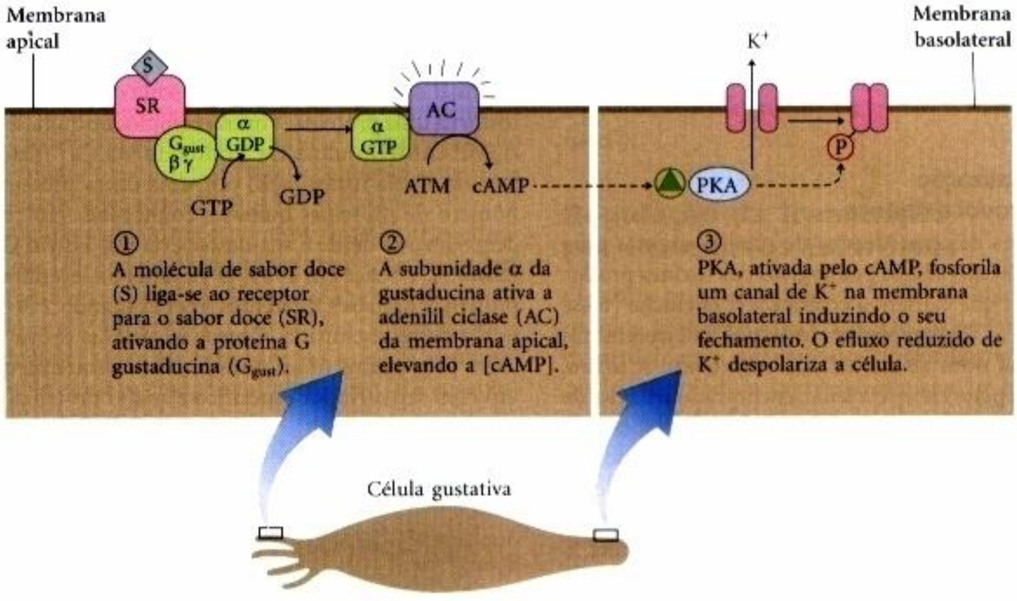
Figura 13-25 – Eventos moleculares da olfação. Estas interações ocorrem nos cílios das células receptoras olfativas.

O sentido do paladar nos vertebrados reflete a atividade dos neurônios gustativos agrupados em papilas gustativas na superfície da língua. Nesses neurônios sensoriais, receptores serpenteantes estão acoplados à proteína G trimérica **gustaducina** (muito semelhante à transducina das células bastonetes e cones). As moléculas de sabor doce são aquelas que se ligam aos receptores nas papilas gustativas doces. Quando a molécula (do sabor) se liga, a gustaducina é ativada pela substituição do GDP ligado pelo GTP e então estimula a produção de cAMP pela adenilil ciclase. A conseqüente elevação da [cAMP] ativa a PKA, que fosforila os canais de K^+ na membrana plasmática, forçando-os a se fechar. O efluxo reduzido do K^+ despolariza a célula (Fig. 13-26). Outras papilas gustativas especializadas em detectar os sabores amargo, azedo e salgado usam várias combinações de mensageiros secundários e de canais em seus mecanismos de transdução.

Proteínas G acopladas aos sistemas de receptores serpenteantes compartilham várias características

Examinaremos agora quatro sistemas (sinalização hormonal, visão, olfato e gustação) nos quais receptores de membrana estão acoplados à enzima, a qual produz mensageiros secundários por meio de proteínas G. Parece que os mecanismos sinalizadores se originaram cedo na evolução; receptores serpenteantes, proteínas G triméricas e adenilil ciclase são encontrados na levedura da cerveja. Os padrões gerais foram conservados, enquanto a introdução da variedade oferece aos organismos modernos a habilidade de responder a uma grande classe de estímulos (Tabela 13-7). Dos aproximadamente 10^5 genes no genoma humano, cerca de 10^3 codificam receptores serpenteantes, incluindo centenas para o estímulo olfatório e vários "receptores órfãos" para os quais ainda não se conhecem ligantes naturais.

Todos os sistemas de transdução bem estudados que agem por meio das proteínas G triméricas compartilham certas características comuns (Fig. 13-27). Os receptores possuem sete segmentos transmembrana, um domínio (geralmente a alça entre as hélices transmembrana 6 e 7) que interage com a proteína G, e um domínio citoplasmático carboxiterminal que sofre fosforilação reversível em vários resíduos de Ser ou Thr. O sítio de ligação do ligante (ou, no caso da recepção da luz, o receptor da luz) está escondido no fundo da membrana e envolve resíduos de vários segmentos transmembrana. A ligação do ligante (ou da luz) induz uma mudança conformacional no receptor, expondo um domínio que interage com uma proteína G. As proteínas G triméricas ativam ou inibem enzimas efetoras (adenilil ciclase, PDE ou fosfolipase C), que alteram a concentração de um mensageiro secundário (cAMP, cGMP, IP_3 ou Ca^{2+}). Nos sistemas de detecção de hormônios, o produto final é uma proteína quinase ativada que regula alguns processos celulares pela fosforilação de uma proteína crítica àquele processo. Nos neurônios sensoriais, o resultado é uma alteração no potencial de membrana e um conseqüente sinal elétrico que passa a um outro neurônio na via, conectando a célula sensorial ao cérebro.


Membrana apical
S
SR
G_{gust} $\beta\gamma$
α GDP
GTP
GDP
AC
α GTP
ATM
cAMP
K⁺
Membrana basolateral
P
PKA
Célula gustativa

① A molécula de sabor doce (S) liga-se ao receptor para o sabor doce (SR), ativando a proteína G gustaducina (G_{gust}).

② A subunidade α da gustaducina ativa a adenilil ciclase (AC) da membrana apical, elevando a [cAMP].

③ PKA, ativada pelo cAMP, fosforila um canal de K⁺ na membrana basolateral induzindo o seu fechamento. O efluxo reduzido de K⁺ despolariza a célula.

Figura 13-26 – Mecanismo de transdução para o sabor doce.

Tabela 13-7 – Alguns sinais transduzidos pela proteína G acoplada aos receptores serpenteantes

Acetilcolina (muscarínico)
Adenosina
Angiotensina
ATP (extracelular)
Bradicinina
Calcitonina
Canabinóides
Catecolaminas
Colecistocinina
Fator de liberação da corticotrofina (CRF)
AMP cíclico (*Dictyostelium discoideum*)
Dopamina
Endotelina
Hormônio folículo-estimulante (FSH)
Ácido γ-aminobutírico (GABA)
Glucagon
Glutamato (metabotrópico)
Hormônio de liberação do hormônio de crescimento (GHRH)
Histamina
Leucotrienos
Luz
Hormônio luteinizante (LH)
Melatonina
Odorantes
Opióides
Ocitocina
Fator ativador de plaquetas
Prostaglandinas
Secretina
Serotonina
Somatostatina
Sabores
Tirotrofina
Hormônio liberador da tirotrofina (TRH)
Peptídeo intestinal vasoativo
Vasopressina
Fatores de conjugação de leveduras

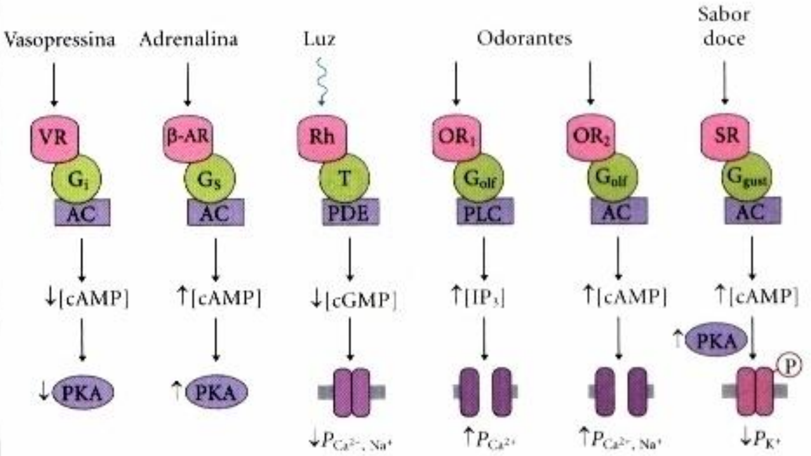

Vasopressina
Adrenalina
Luz
Odorantes
Sabor doce
VR
G_i
AC
↓[cAMP]
↓ PKA
β-AR
G_s
AC
↑[cAMP]
↑ PKA
Rh
T
PDE
↓[cGMP]
$\downarrow P_{Ca^{2+}, Na^+}$
OR_1
G_{olf}
PLC
$\uparrow[IP_3]$
$\uparrow P_{Ca^{2+}}$
OR_2
G_{olf}
AC
↑[cAMP]
$\uparrow P_{Ca^{2+}, Na^+}$
SR
G_{gust}
AC
↑[cAMP]
↑ PKA
P
$\downarrow P_{K^+}$

Figura 13-27 – Características comuns dos sistemas de sinalização que detectam hormônios, luz, odores e sabores. Receptores serpenteantes fornecem a especificidade ao sinal, e sua interação com as proteínas G respondem pela amplificação do sinal. As proteínas G heterotriméricas ativam as enzimas efetoras: a adenilil ciclase (AC), a fosfolipase C (PLC) e as fosfodiesterases (PDE) que degradam o cAMP e o cGMP. Mudanças nas concentrações dos mensageiros secundários (cAMP, cGMP, IP_3) levam a alterações das atividades enzimáticas por fosforilação ou alterações na permeabilidade (*P*) das membranas externas ao Ca^{2+}, Na^+ e K^+. A despolarização ou a hiperpolarização resultante na célula sensorial (o sinal) é passada através de circuitos de neurônios aos centros sensoriais no cérebro. Nos casos mais bem estudados, a dessensibilização inclui a fosforilação do receptor e a ligação de uma proteína (arrestina) que interrompe as interações receptor–proteína G. (VR representa o receptor da vasopressina; as abreviações dos outros receptores e das proteínas G são idênticas àquelas usadas anteriormente.)

Todos esses sistemas são auto-inativantes. O GTP ligado é convertido em GDP pela atividade GTPase intrínseca das proteínas G, freqüentemente aumentada pelas proteínas ativadoras da GTPase (GAPs) ou proteínas RGS ("regulators of *G*-protein signaling").

A ruptura da sinalização da proteína G provoca doença

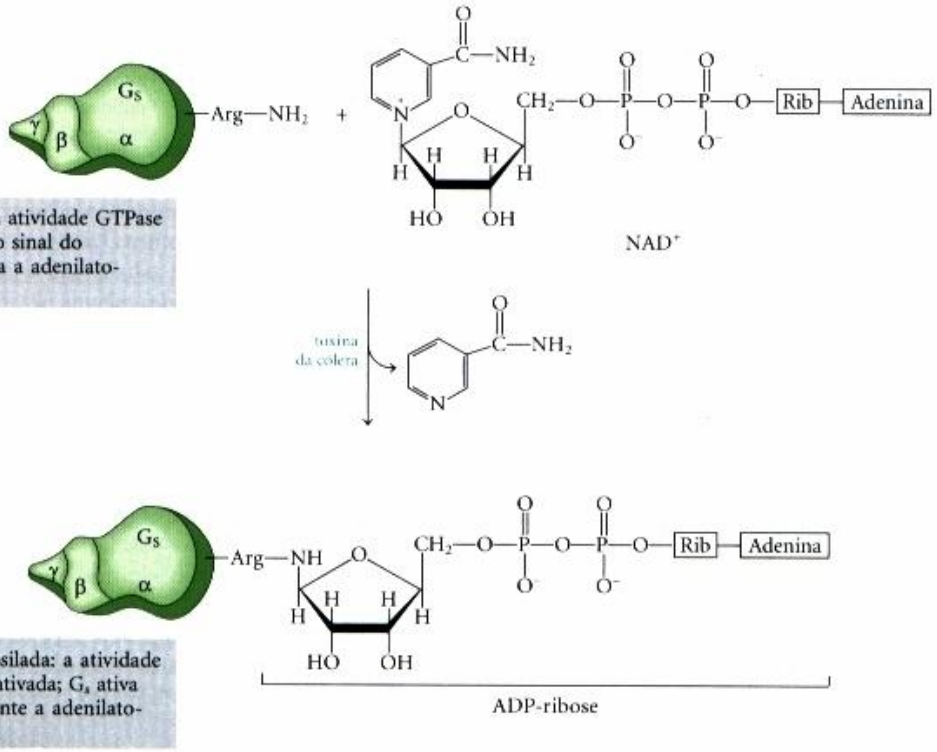
Estudos bioquímicos das transduções de sinal levaram a uma melhor compreensão dos efeitos patológicos das toxinas produzidas pelas bactérias que causam a cólera e a coqueluche (tosse comprida). Ambas as toxinas são enzimas que interferem nas transduções de sinal normais no animal hospedeiro. **A toxina da cólera**, secretada pelo *Vibrio cholerae*, encontrado na água de beber contaminada, catalisa a transferência da ADP-ribose do NAD^+ para a subunidade α da G_s (Fig. 13-28), bloqueando sua atividade GTPase e, portanto, tornando G_s permanentemente ativada. Isso resulta na ativação contínua da adenilil ciclase das células epiteliais do intestino e a [cAMP] cronicamente alta, o que desencadeia a secreção continuada de Cl^-, HCO_3^- e água na luz intestinal. A perda de eletrólitos e a desidratação resultante são as principais doenças na cólera. A **toxina pertussis**, produzida pela *Bordetella pertussis*, catalisa a ADP-ribosilação da G_i, prevenindo o deslocamento do GDP pelo GTP e bloqueando a inibição da adenilil ciclase pela G_i. Esse defeito produz dois dos sintomas da tosse comprida: hipersensibilidade aos histamínicos e diminuição da glicose sangüínea.

A Fosforilação como um Mecanismo Regulatório

Um denominador comum nas transduções de sinal é a regulação final da atividade de uma proteína quinase, uma enzima que fosforila uma proteína. Vimos exemplos de quinases ativadas por cGMP, cAMP, insulina, Ca^{2+}/calmodulina, Ca^{2+}/diacilglicerol, Ras ativada e pela fosforilação por uma outra proteína quinase. O número de proteínas quinases conhecidas tem crescido consideravelmente desde a sua descoberta por Edwin G. Krebs e Edmond H. Fischer em 1959. O genoma da levedura codifica 120 proteínas quinases diferentes, representando 2% de todo o genoma deste organismo. Outros eucariotos provavelmente possuem pelo menos todos esses genes de proteínas quinases, cada um com seu ativador específico e sua(s) proteína(s)-alvo.

Edwin G. Krebs

Edmond H. Fischer



G_s normal: a atividade GTPase interrompe o sinal do receptor para a adenilato-ciclase.

G_s ADP-ribosilada: a atividade GTPase é inativada; G_s ativa constantemente a adenilato-ciclase.

Figura 13-28 – Toxinas produzidas por bactérias que causam a cólera e a coqueluche (pertussis). Estas toxinas são enzimas que catalisam a transferência da porção ADP-ribose do NAD^+ a um resíduo de Arg das proteínas G: G_s no caso da cólera (como mostrado aqui) e G_i na coqueluche. As proteínas G assim modificadas falham em responder aos estímulos hormonais normais. A patologia de ambas as doenças resulta da regulação defeituosa da adenilil ciclase e da superprodução do cAMP.

A localização das proteínas quinases e fosfatases afetam a especificidade das proteínas-alvo

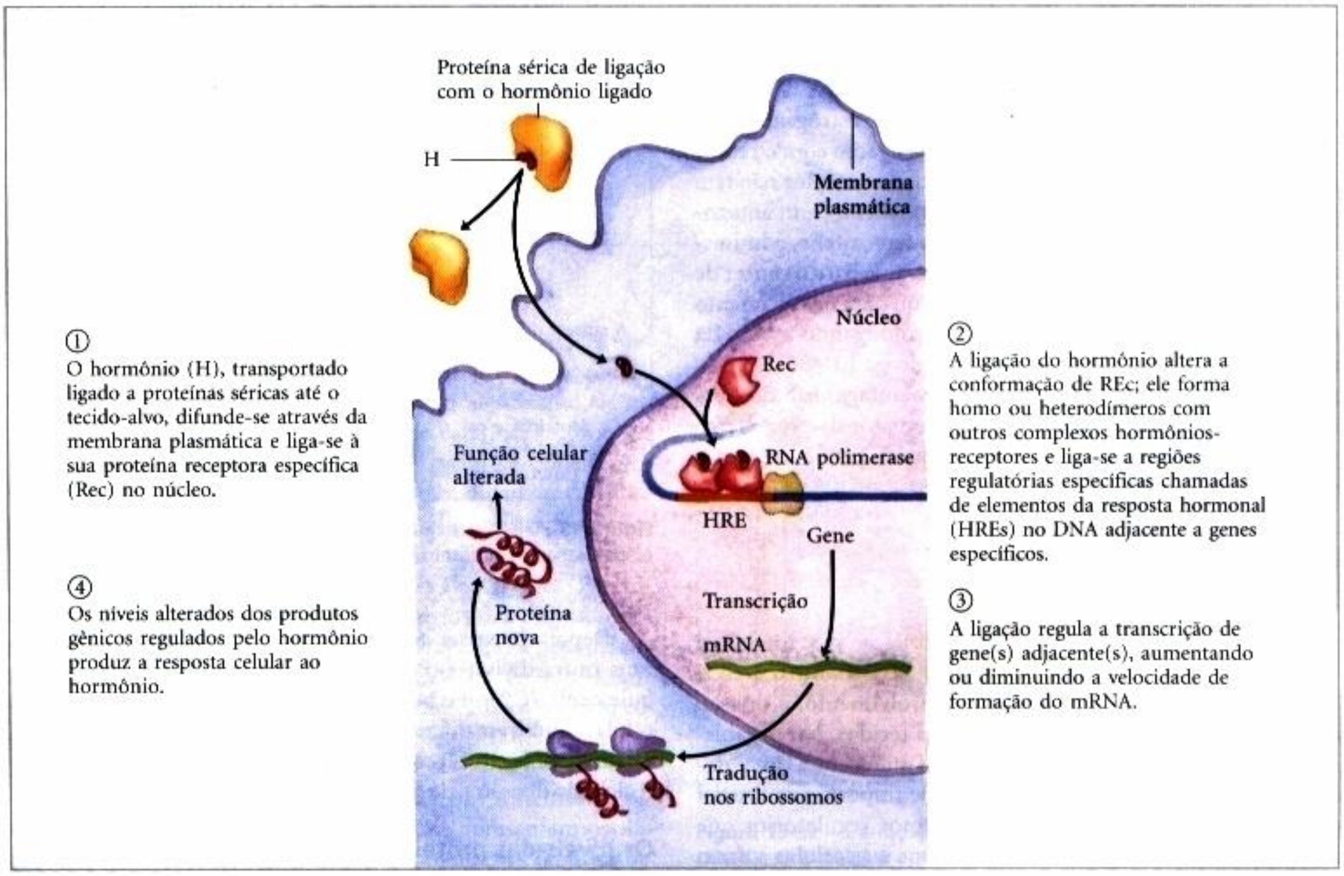
Vários tipos de proteínas quinases e fosfatases estão localizados em regiões subcelulares específicas, mantidas próximas a seus substratos protéicos por uma proteína-alvo. Por exemplo, as enzimas que catalisam a regulação de síntese e degradação do glicogênio no músculo esquelético estão fortemente associadas com os grânulos de glicogênio. A proteína fosfatase-1 (PP-1) é parte da maquinaria regulatória; ela remove fosfatos de resíduos da Ⓟ-Ser e da Ⓟ-Thr da glicogênio sintase e da fosforilase quinase, revertendo os efeitos regulatórios da proteína quinase dependente de cAMP, PKA. A PP-1 possui duas subunidades: a subunidade catalítica (C) e a subunidade R_G, que liga a subunidade C ao grânulo de glicogênio, garantindo acesso fácil aos substratos que a PP-1 desfosforila.

As subunidades-alvo mantêm também algumas proteínas quinases próximas a seus substratos. A subunidade R da PKA (Fig. 13-14) associa-se fortemente a uma família de proteínas-alvo chamadas AKAPs (proteínas ancoradouras de uma quinase; "*a* *k*inase *a*nchoring *p*roteins"), cada uma ancorando PKA a uma região específica da célula — mitocôndria, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, matriz nuclear ou grânulos secretórios — presumivelmente em grande proximidade aos substratos protéicos críticos da PKA. Tal localização da PKA, combinada com a produção de gradientes espaciais na [cAMP] pela localização das atividades da adenilil ciclase e da fosfodiesterase, podem fornecer um mecanismo para a regulação separada de vários substratos da PKA na mesma célula. As várias isoenzimas da proteína quinase C são também localizadas diferencialmente por meio da sua associação com proteínas âncoras chamadas de RACKs (receptores para a quinase C ativada; "*r*eceptors for *a*ctivated *C* *k*inase") ou PICKs (proteínas que interagem com a quinase C; "*p*roteins that *i*nteract with *C* *k*inase").

Regulação da Transcrição por Hormônios Esteróides

O grande grupo de esteróides, ácido retinóico (retinóide) e hormônios tireóideos exerce seus efeitos por um mecanismo fundamentalmente diferente dos outros hormônios: eles agem no núcleo alterando a expressão gênica. Por essa razão discutiremos seu modo de ação em detalhes no Capítulo 28, junto com os outros mecanismos que regulam a expressão gênica. Aqui ofereceremos uma rápida visão geral.

Os hormônios esteróides (estrógeno, progesterona e cortisol, por exemplo) são muito hidrofóbicos para se dissolver facilmente no sangue, eles são transportados por proteínas transportadoras específicas do seu local de liberação até seus tecidos-alvo. Nas células-alvo, esses hormônios passam através da membrana plasmática por simples difusão e se ligam a proteínas receptoras específicas no núcleo (Fig. 13-29). A ligação do hormônio desencadeia alterações na conformação das proteínas receptoras de tal forma que elas se tornam capazes de interagir com seqüências regulatórias específicas no DNA chamadas de **elementos da resposta hormonal (HREs** — "*h*ormone *r*esponse



① O hormônio (H), transportado ligado a proteínas séricas até o tecido-alvo, difunde-se através da membrana plasmática e liga-se à sua proteína receptora específica (Rec) no núcleo.

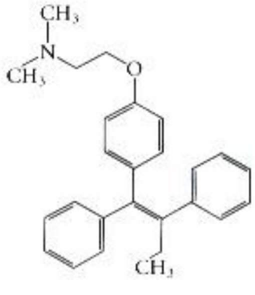
② A ligação do hormônio altera a conformação de REc; ele forma homo ou heterodímeros com outros complexos hormônios-receptores e liga-se a regiões regulatórias específicas chamadas de elementos da resposta hormonal (HREs) no DNA adjacente a genes específicos.

③ A ligação regula a transcrição de gene(s) adjacente(s), aumentando ou diminuindo a velocidade de formação do mRNA.

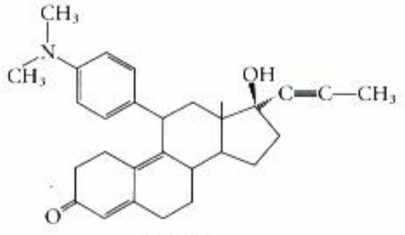
④ Os níveis alterados dos produtos gênicos regulados pelo hormônio produz a resposta celular ao hormônio.

Figura 13-29 – Mecanismos gerais pelos quais os hormônios esteróides, tireóideos, retinóides e a vitamina D regulam a expressão gênica. Os detalhes da transcrição e da síntese protéica são discutidos nos Capítulos 26 e 27.

elements"), alterando dessa forma a expressão gênica (veja Fig. 28-33). O complexo hormônio ligado ao receptor pode ou aumentar ou suprimir a expressão de genes específicos adjacentes aos HREs. Horas ou dias são requeridos para esses reguladores terem seu efeito completo — o tempo requerido para as alterações na síntese de RNA e subseqüente síntese protéica se tornarem evidentes no metabolismo alterado.



Tamoxifeno



RU486
(mifepristona)

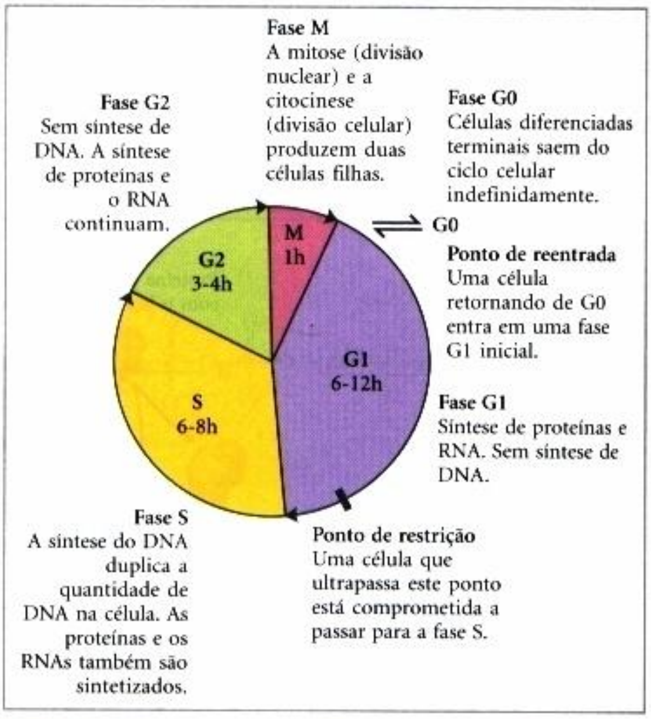
A especificidade da interação esterol-receptor é explorada no uso da droga **tamoxifeno** para tratar o câncer da mama. Em alguns tipos de câncer da mama, a divisão das células cancerosas depende da presença continuada do hormônio estrógeno. O tamoxifeno compete com o estrógeno para a ligação com o receptor do estrógeno, mas o complexo tamoxifeno-receptor não tem nenhum efeito na expressão gênica; o tamoxifeno é um antagonista do estrógeno. Conseqüentemente, o tamoxifeno, administrado após cirurgia ou durante a quimioterapia para o câncer de mama dependente de estrógeno, diminui ou pára o crescimento das células cancerosas remanescentes, prolongando a vida da paciente. Um outro análogo esteróide, a droga **RU486**, é usado para interromper gravidezes iniciais. Um antagonista do hormônio progesterona, RU486, liga-se ao receptor da progesterona e bloqueia as ações do hormônio essenciais para a implantação do ovo fecundado no útero.

Regulação do Ciclo Celular por Proteínas Quinases

Um dos mais dramáticos papéis da fosforilação de proteínas é a regulação do ciclo celular dos eucariotos. Durante o crescimento embrionário e o posterior desenvolvimento, a divisão celular ocorre em virtualmente todos os tecidos. No organismo adulto, a maioria dos tecidos torna-se quiescente. Uma "decisão" da célula de se dividir ou não é de importância crucial para o organismo. Quando os mecanismos regulatórios que limitam a divisão celular estão defeituosos e as células sofrem divisões não reguladas, o resultado é catastrófico — o câncer. A divisão celular apropriada requer uma seqüência de eventos bioquímicos precisamente ordenados que garanta a cada célula filha um complemento inteiro das moléculas requeridas para a vida. Investigações sobre o controle da divisão celular em diversas células eucarióticas têm revelado mecanismos regulatórios universais. Proteínas quinases e fosforilação de proteínas são centrais ao mecanismo temporal que determina a entrada na divisão celular e garante a passagem ordenada por esses eventos.

O ciclo celular possui quatro etapas

A divisão celular nos eucariotos ocorre em quatro etapas bem definidas (Fig. 13-30). Na fase S (síntese), o DNA é replicado para produzir cópias para ambas as células filhas. Na fase G2 (G indica o intervalo entre as divisões; do inglês, "gap"), novas proteínas são sintetizadas e a célula dobra aproximadamente em tamanho. Na fase M (mitose), o envelope nuclear materno se degrada, os cromossomos pareados são puxados para os pólos opostos da célula, cada conjunto dos cromossomos filhos é envolto por um envelope nuclear formado de novo, e a citocinese pinça a célula no meio, produzindo duas células filhas. Em tecidos embrionários ou em proliferação rápida, cada célula filha se divide novamente, mas apenas após um período de espera (G1). Em células animais em cultura, o processo inteiro leva cerca de 24 horas.



Fase M
A mitose (divisão nuclear) e a citocinese (divisão celular) produzem duas células filhas.
Fase G2
Sem síntese de DNA. A síntese de proteínas e o RNA continuam.
Fase G0
Células diferenciadas terminais saem do ciclo celular indefinidamente.
G0
Ponto de reentrada
Uma célula retornando de G0 entra em uma fase G1 inicial.
M
1h
G2
3-4h
G1
6-12h
S
6-8h
Fase G1
Síntese de proteínas e RNA. Sem síntese de DNA.
Fase S
A síntese do DNA duplica a quantidade de DNA na célula. As proteínas e os RNAs também são sintetizados.
Ponto de restrição
Uma célula que ultrapassa este ponto está comprometida a passar para a fase S.

Figura 13-30 – Ciclo celular eucariótico. Os tempos para as quatro etapas variam; entretanto, os mostrados são típicos.

Depois de passar pela mitose e G1, uma célula ou continua uma outra divisão ou cessa de dividir, entrando em uma fase quiescente (G0) que pode durar horas, dias ou toda a vida da célula. Células em diferenciação terminal estão na fase G0. Quando uma célula em G0 começa a se dividir novamente, ela reinicia o ciclo de divisão pela fase G1.

Os níveis das proteínas quinases dependentes de ciclinas oscilam

O tempo no ciclo celular é controlado por uma família de proteínas quinases com atividades que mudam em resposta aos sinais celulares. Fosforilando proteínas específicas em intervalos de

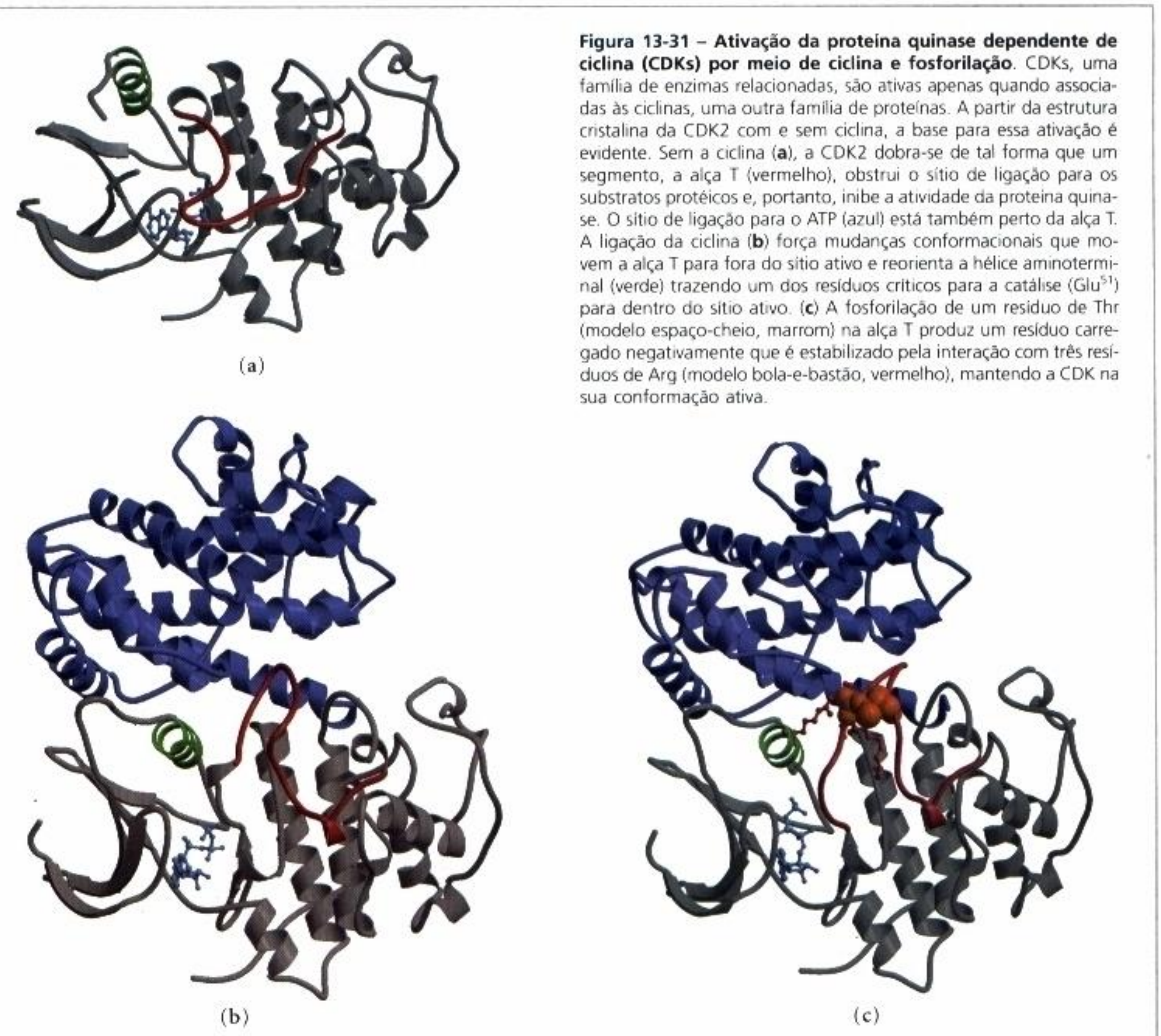


Figura 13-31 – Ativação da proteína quinase dependente de ciclina (CDKs) por meio de ciclina e fosforilação. CDKs, uma família de enzimas relacionadas, são ativas apenas quando associadas às ciclinas, uma outra família de proteínas. A partir da estrutura cristalina da CDK2 com e sem ciclina, a base para essa ativação é evidente. Sem a ciclina (**a**), a CDK2 dobra-se de tal forma que um segmento, a alça T (vermelho), obstrui o sítio de ligação para os substratos protéicos e, portanto, inibe a atividade da proteína quinase. O sítio de ligação para o ATP (azul) está também perto da alça T. A ligação da ciclina (**b**) força mudanças conformacionais que movem a alça T para fora do sítio ativo e reorienta a hélice aminoterminal (verde) trazendo um dos resíduos críticos para a catálise (Glu^{51}) para dentro do sítio ativo. (**c**) A fosforilação de um resíduo de Thr (modelo espaço-cheio, marrom) na alça T produz um resíduo carregado negativamente que é estabilizado pela interação com três resíduos de Arg (modelo bola-e-bastão, vermelho), mantendo a CDK na sua conformação ativa.

tempo precisos, essas proteínas quinases regem as atividades metabólicas da célula para produzir uma divisão celular ordenada. Essas quinases são heterodímeros com uma subunidade regulatória, as **ciclinas**, e uma subunidade catalítica, a **proteína quinase dependente de ciclina** (**CDK** — "*c*yclin-*d*ependent protein *k*inase"). Na ausência da ciclina, a subunidade catalítica é virtualmente inativa. Quando a ciclina se liga, o sítio catalítico se abre, um resíduo essencial para a catálise torna-se acessível e a atividade da subunidade catalítica aumenta 10.000 vezes (Fig. 13-31). As células animais possuem pelo menos dez ciclinas diferentes (designadas como A, B, e assim por diante) e pelo menos oito quinases dependentes de ciclina (CDK1 até CDK8), que agem em várias combinações em pontos específicos no ciclo celular. As plantas também usam uma família de CDKs para regular sua divisão celular.

Em uma população de células animais que sofrem uma divisão sincrônica, algumas atividades CDKs apresentam oscilações impressionantes (Fig. 13-32). Essas oscilações são o resultado de quatro mecanismos de regulação sobre a atividade CDK: fosforilação ou desfosforilação da CDK, degradação controlada da subunidade ciclina, síntese periódica das CDKs e ciclinas, e ação de proteínas inibidoras específicas das CDKs.

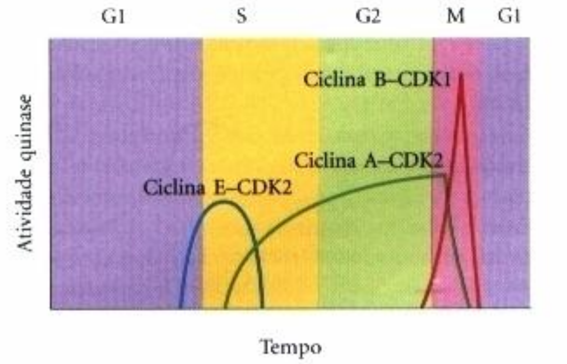
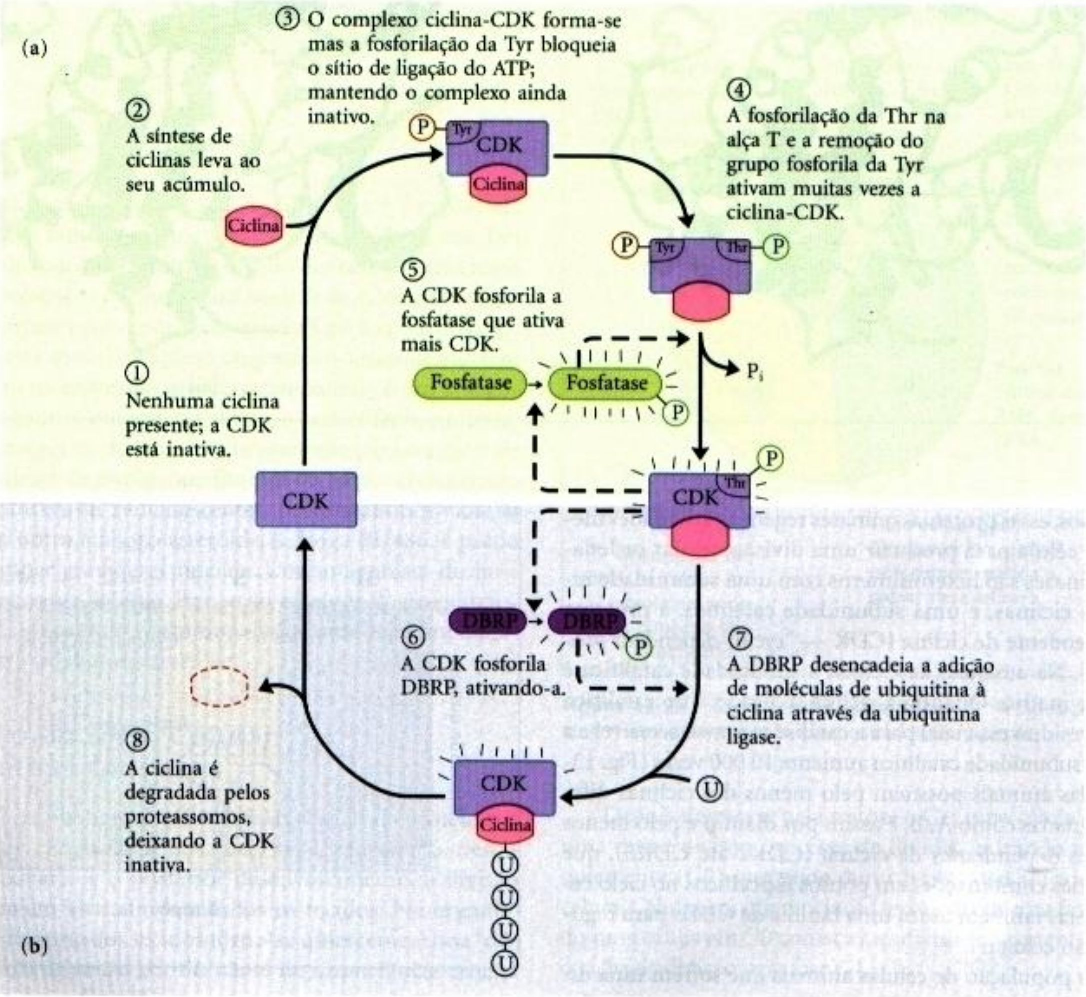


Figura 13-32 – Variações nas atividades das CDKs específicas durante o ciclo celular em animais. A atividade da ciclina E–CDK2 atinge um máximo próximo dos limites das fases G1–S, onde a enzima ativa desencadeia a síntese das enzimas requeridas para a síntese do DNA (veja Fig. 13-35). A ciclina A–CDK eleva-se durante as fases S e G2, caindo depois abruptamente na fase M, quando a ciclina B–CDK atinge o máximo.

Regulação das CDKs pela fosforilação. A atividade da CDK é impressionantemente afetada pela fosforilação e desfosforilação de dois resíduos críticos na proteína (Fig. 13-33a). A fosforilação da Tyr^{15} próxima da extremidade aminoterminal torna a CDK2 inativa; o resíduo Ⓟ-Tyr está no sítio de ligação do ATP na quinase, e a carga negativa do fosfato bloqueia a entrada do ATP. Uma fosfatase específica desfosforila este resíduo Ⓟ-Tyr, permitindo a ligação do ATP. A fosforilação da Thr^{160} na "alça T" da CDK, catalisada pela quinase ativadora da CDK, força a alça T para fora da fenda de ligação do substrato, permitindo a ligação do substrato e a atividade catalítica.

Uma circunstância que desencadeia esse mecanismo de controle é a presença de quebras em uma fita simples do DNA, que leva à parada do ciclo celular em G2. Uma proteína quinase específica (chamada de Rad3 na levedura), que é ativada pelas quebras na fita simples do DNA, desencadeia uma cascata que leva à inativação da fosfatase que desfosforila a Tyr^{15} da CDK. A CDK permanece inativa e a célula fica parada em G2. A célula não se dividirá até que o DNA seja reparado e os efeitos da cascata sejam revertidos.

Degradação controlada da ciclina. A degradação proteolítica temporalmente precisa e altamente específica das ciclinas mitóticas regula a atividade CDK durante todo o ciclo celular. O progresso ao longo da mitose requer primeiro a ativação e depois a destruição das ciclinas A e B, que ativam a subunidade catalítica da CDK da fase M. Essas ciclinas contêm próximo de sua extremidade aminoterminal a seqüência Arg–Thr–Ala–Leu–Gly–Asp–Ile–Gly–Asn, a "caixa de destruição" que as marcam para a degradação. (Este uso do termo "caixa" deriva da prática comum, na esquematização da seqüência de um ácido nucléico ou proteína, de envolver dentro de uma caixa uma seqüência curta de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos com alguma função específica. Isso não implica nenhuma estrutura tridimensional.) Uma proteína que reconhece essa seqüência, chamada de DBRP (proteína reconhecedora da caixa de destruição; "*d*estruction *b*ox *r*ecognizing *p*rotein"), inicia o processo de degradação da ciclina trazendo juntas a ciclina e uma outra proteína, a **ubiquitina**. A ciclina e a ubiquitina ativada são unidas covalentemente pela enzima ubiquitina ligase (Fig. 13-33b). Muitas outras moléculas de ubiquitina são anexadas, fornecendo o sinal para um complexo enzimático proteolítico, ou **proteassomo**, para degradar a ciclina.



① Nenhuma ciclina presente; a CDK está inativa.

② A síntese de ciclinas leva ao seu acúmulo.

③ O complexo ciclina-CDK forma-se mas a fosforilação da Tyr bloqueia o sítio de ligação do ATP; mantendo o complexo ainda inativo.

④ A fosforilação da Thr na alça T e a remoção do grupo fosforila da Tyr ativam muitas vezes a ciclina-CDK.

⑤ A CDK fosforila a fosfatase que ativa mais CDK.

⑥ A CDK fosforila DBRP, ativando-a.

⑦ A DBRP desencadeia a adição de moléculas de ubiquitina à ciclina através da ubiquitina ligase.

⑧ A ciclina é degradada pelos proteassomos, deixando a CDK inativa.

Figura 13-33 – Regulação da CDK pela fosforilação e proteólise. (**a**) A proteína quinase dependente de ciclina, ativada durante a mitose (a CDK da fase M), possui uma "alça T" que pode se dobrar no sítio de ligação do substrato. Quando um resíduo de Thr na alça T está fosforilado, a alça se move para fora do sítio de ligação do substrato, ativando a CDK muitas vezes. (**b**) O complexo ativo da CDK-ciclina desencadeia sua própria inativação pela fosforilação da DBRP (proteína reconhecedora da caixa de destruição). A DBRP e a ubiquitina ligase ligam então várias moléculas de ubiquitina (U) à ciclina, marcando-a para a destruição pelos proteassomos, complexo de enzimas proteolíticas.

O que controla o tempo da degradação da ciclina? Há um tipo de regulação em que o aumento da atividade CDK ativa a proteólise da ciclina. Como mostrado na Figura 13-33, a ciclina recentemente sintetizada se associa e ativa a CDK, que fosforila e ativa a DBRP. A DBRP ativa induz então a proteólise da ciclina. A diminuição da ciclina provoca a queda da atividade CDK, e a atividade da DBRP também cai por meio de lenta e constante defosforilação e inativação por uma DBRP fosfatase. O nível da ciclina é finalmente restaurado pela síntese de novas moléculas de ciclinas.

O papel da ubiquitina e o dos proteassomos não estão limitados à regulação da ciclina, como veremos no Capítulo 27, ambos estão também envolvidos na regulação da degradação das proteínas celulares, um processo fundamental para a economia doméstica celular.

A síntese regulada das CDKs e das ciclinas. O terceiro mecanismo de alteração da atividade CDK é a regulação da velocidade da síntese da ciclina ou da CDK ou de ambas. Por exemplo, a ciclina D, a ciclina E, a CDK2 e a CDK4 são sintetizadas apenas quando um fator de transcrição, E2F, estiver presente no núcleo para ativar a transcrição desses genes. A síntese do E2F é, por seu lado, regulada por sinais extracelulares tais como os **fatores de crescimento** e as **citocinas** (indutores da divisão celular), compostos julgados essenciais para divisão das células de mamíferos em cultura. Esses fatores de crescimento induzem a síntese de fatores nucleares específicos de transcrição, essenciais para a produção de enzimas da síntese do DNA. Os fatores de crescimento desencadeiam a fosforilação das proteínas Jun e Fos, fatores de transcrição que promovem a síntese de vários produtos gênicos, incluindo ciclinas, CDKs e E2F. E2F, por seu lado, controla a produção de várias enzimas essenciais para a síntese dos desoxirribonucleotídeos e do DNA, permitindo às células entrar na fase S (Fig. 13-34).

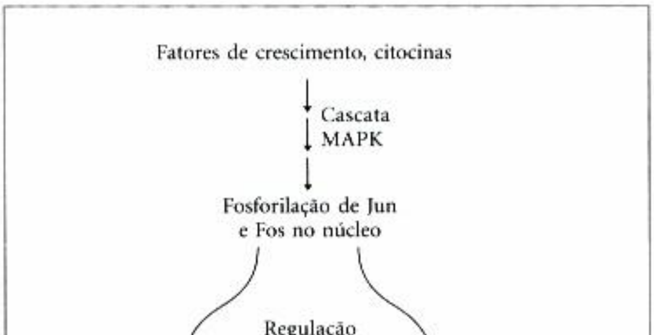

Fatores de crescimento, citocinas
Cascata MAPK
Fosforilação de Jun e Fos no núcleo
Regulação transcricional
Ciclinas, CDKs
Fator de transcrição E2F
Regulação transcricional
Enzimas para a síntese do DNA
Passagem da fase G1 para a S

Figura 13-34 – Regulação da divisão celular pelos fatores de crescimento. A via dos fatores de crescimento até a divisão celular passa pelas cascatas de enzimas que ativam a MAPK (proteína quinase dependente de mitógenos, veja Fig. 13-7); da fosforilação dos fatores de transcrição nucleares, Jun e Fos; e da atividade do fator de transcrição E2F, que promove a síntese de várias enzimas essenciais para a síntese do DNA.

Inibição das CDKs. Finalmente, inibidores protéicos específicos ligam-se e inativam CDKs específicas. Uma dessas proteínas é a p21, que discutiremos a seguir.

Esses quatro mecanismos de controle modulam as atividades das CDKs específicas que, por sua vez, controlam se uma célula irá se dividir, diferenciar, tornar permanentemente quiescente ou iniciar um novo ciclo de divisões depois de um período de quiescência. Os detalhes da regulação do ciclo celular, tais como o número das diferentes ciclinas e quinases e as combinações em que elas atuam, diferem de organismo para organismo, entretanto, o mecanismo básico conservou-se na evolução de todas as células eucarióticas.

As CDKs regulam a divisão celular pela fosforilação de proteínas críticas

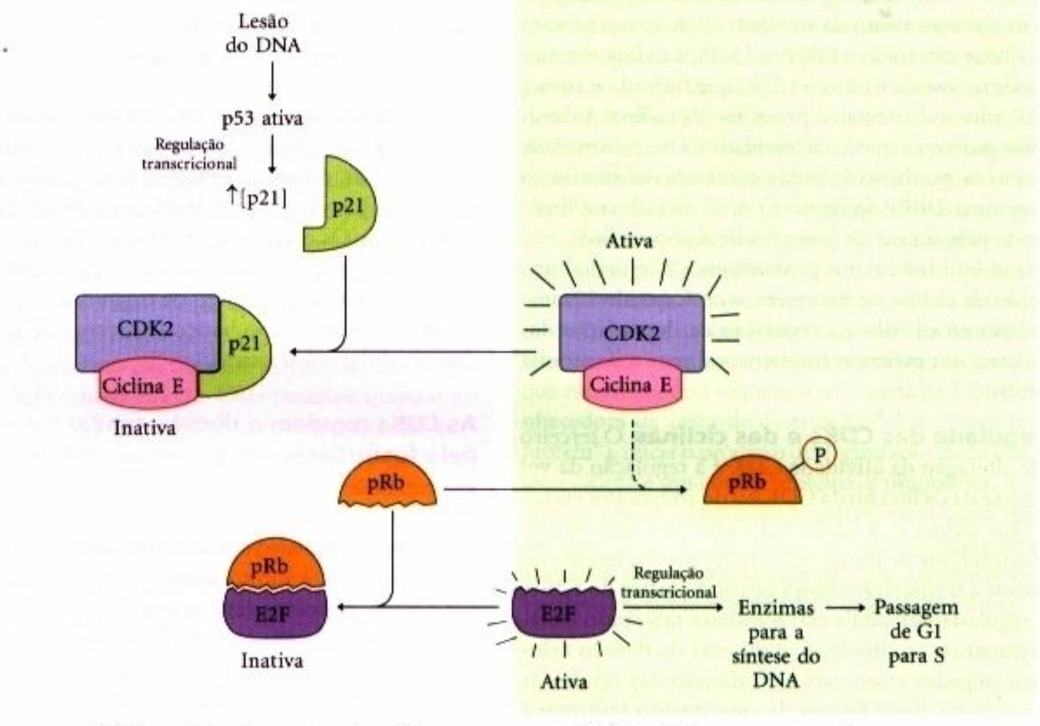
Examinamos como o controle da atividade da CDK é mantido, entretanto, como a atividade da CDK controla o ciclo celular? A lista de proteínas-alvo conhecidas, nas quais as CDKs agem, continua a crescer, e muito ainda permanece para ser conhecido. Entretanto, podemos ver um padrão geral, atrás da regulação da CDK, inspecionando o efeito das CDKs na estrutura da laminina, da miosina e na atividade da proteína retinoblastoma.

A estrutura do envelope nuclear é mantida em parte pela rede altamente organizada de filamentos intermediários, compostos da proteína laminina. A quebra da membrana nuclear, antes da segregação das cromátides filhas na mitose, é em parte devida à fosforilação da laminina pela CDK, que induz a despolarização dos filamentos da laminina.

Um segundo alvo da quinase é a maquinaria contrátil da actomiosina direcionada pelo ATP, que estreita uma célula em divisão em duas partes iguais durante a citocinese. Depois da divisão, a CDK fosforila uma pequena subunidade regulatória da miosina, provocando a dissociação da miosina dos filamentos de actina e inativando a maquinaria contrátil. A defosforilação subseqüente permite a remontagem do aparelho contrátil para o próximo ciclo de citocinese.

Um terceiro, e muito importante substrato da CDK, é a **proteína do retinoblastoma, pRb**, que participa de um mecanismo que interrompe a divisão celular em G1, se uma lesão no DNA for detectada (Fig. 13-35). Assim chamada por ter sido descoberta em uma linhagem celular de tumor da retina, a pRb funciona em todos os tipos celulares regulando a divisão celular em resposta a uma variedade de estímulos. A pRb não-fosforilada se liga ao fator de transcrição E2F, enquanto, ligado à pRb, o E2F não consegue promover a transcrição de um grupo de genes necessários para a síntese do DNA (os genes para a DNA polimerase α, a ribonucleotídeo redutase e outras proteínas). Nesse estado, o ciclo celular não consegue prosseguir de G1 para a fase S, a etapa que compromete uma célula à mitose e à divisão celular. O mecanismo de bloqueio pRb-E2F é aliviado quando a pRb for fosforilada pela ciclina E–CDK2, que ocorre em resposta a um sinal para que a divisão celular prossiga.

Quando uma lesão do DNA, como a quebra de uma fita simples, for detectada pela proteína p53, essa proteína age como um fator de transcrição que estimula a síntese da proteína p21, que inibe a atividade da proteína quinase ciclina E–CDK2. Na presença de p21, pRb permanece desfosforilida e ligada ao E2F, bloqueando a atividade desse fator de transcrição, e a célula fica parada em G1. Isso oferece tempo para a célula reparar o seu DNA antes de entrar na fase S, evitando portanto a transferência potencialmente desastrosa de um genoma defeituoso para uma ou ambas as células filhas.



Divisão celular bloqueada pela p53

Divisão celular ocorre normalmente

Figura 13-35 – Regulação da passagem entre G1 e S pela fosforilação da pRb. Quando a proteína retinoblastoma, pRb, está fosforilada, ela não consegue se ligar e inativar E2F, um fator de transcrição que promove a síntese das enzimas essenciais para a síntese do DNA. Se a proteína p53 detecta o DNA lesado, ela estimula a síntese da p21, que se liga e inibe a ciclina-CDK2, prevenindo a fosforilação da pRb. A pRb não-fosforilada se liga e inativa o E2F, bloqueando a passagem de G1 para S até que o DNA tenha sido reparado.

Oncogenes, Genes Supressores de Tumores e Morte Celular Programada

Tumores e cânceres são resultado de uma divisão celular descontrolada. Normalmente, a divisão celular é regulada por uma família de **fatores de crescimento** extracelulares, proteínas que induzem as células em repouso a se dividir e, em alguns casos, a se diferenciar. Alguns fatores de crescimento estimulam a divisão apenas daquelas células com receptores apropriados, outros possuem um efeito mais geral. Defeitos na síntese, na regulação ou no reconhecimento dos fatores de crescimento podem levar ao câncer.

Os oncogenes são formas mutantes dos genes para as proteínas que regulam o ciclo celular

Os **oncogenes** foram originalmente descobertos em vírus causadores de tumores, depois, descobriu-se que eram muito semelhantes ou derivados de genes presentes em células hospedeiras animais, chamadas de proto-oncogenes, que codificam proteínas reguladoras do crescimento. Durante as infecções virais, a seqüência de DNA de um proto-oncogene é algumas vezes copiada pelo vírus e incorporada em seu genoma (Fig. 13-36). Em algum lugar, durante o ciclo da infecção viral, o gene pode tornar-se defeituoso por truncamento ou mutação. Quando esse oncogene viral é expresso em sua célula hospedeira durante uma infecção subseqüente, a proteína anormal interfere na regulação do crescimento celular, resultando às vezes em um tumor.

Os proto-oncogenes podem tornar-se oncogenes sem um intermediário viral. Rearranjos cromossômicos, agentes químicos e radiação estão entre os fatores que podem causar mutações oncogênicas. As mutações que produzem os oncogenes são geneticamente dominantes; se qualquer um dos pares cromossomos contém um gene defeituoso, esse produto gênico envia o sinal "dividir", o que levará a um tumor. O defeito oncogênico pode estar em qualquer uma das proteínas envolvidas na comunicação do sinal "dividir". Conhecemos oncogenes que são proteínas secretoras, fatores de crescimento, proteínas transmembrana (receptores), proteínas citoplasmáticas (proteínas G e proteínas quinases) e fatores de transcrição nuclear que controlam a expressão de genes essenciais para a divisão celular (Jun, Fos).

Alguns oncogenes codificam receptores de superfície com sítios de ligação ao sinal defeituosos ou ausentes, de modo que a atividade da tirosina quinase seja desregulada. Por exemplo, a proteína ErbB é essencialmente idêntica ao receptor normal para o fator de crescimento epidérmico (EGF), exceto pelo fato de que ErbB não possui o domínio aminoterminal que normalmente se liga ao EGF (Fig. 13-37) e conseqüentemente envia o sinal para se dividir, estando o EGF presente ou não. Uma variante do Erb, o produto do oncogene *erb*B2 (para uma explicação do uso de abreviações em nomear genes e seus produtos, veja Capítulo 25), é comumente associada com os cânceres do epitélio glandular na mama, estômago e ovário.

Formas mutantes da proteína G Ras são comuns nas células tumorais. O oncogene *ras* codifica uma proteína com sítio de ligação ao GTP normal mas sem atividade GTPase. A proteína mutante Ras está, portanto, sempre em sua forma ativada (ligada ao GTP), independentemente dos sinais vindos através do receptor normal. O resultado pode ser o crescimento desregulado. Mutações em *ras* estão associadas com 30 a 50% dos carcinomas do pulmão e colo e mais de 90% dos carcinomas pancreáticos.

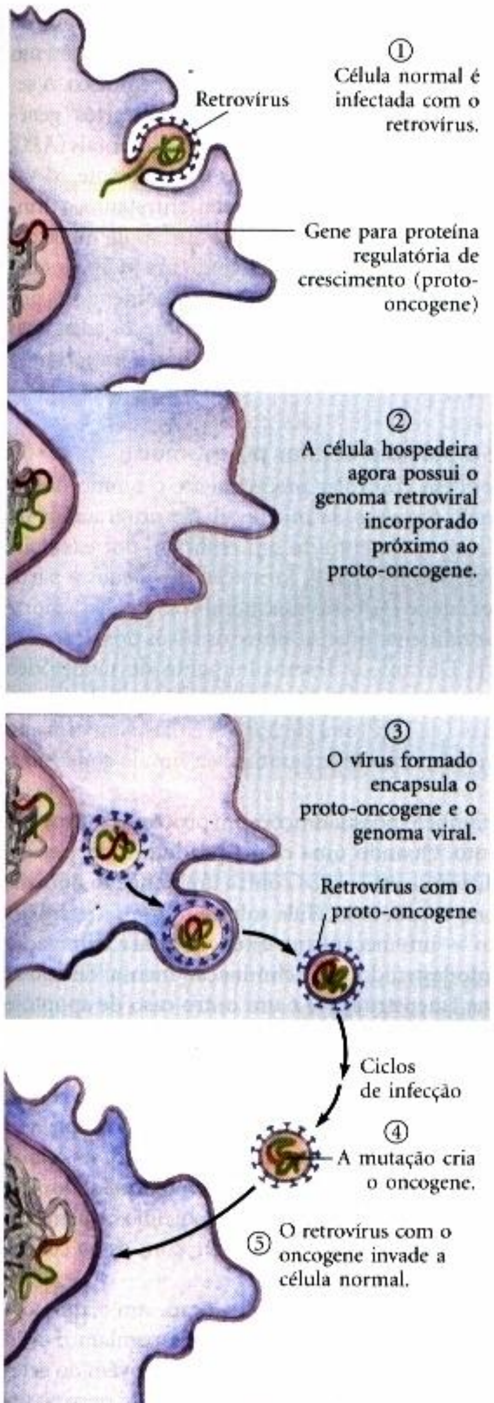

①
Célula normal é infectada com o retrovírus.
Retrovírus
Gene para proteína regulatória de crescimento (proto-oncogene)
②
A célula hospedeira agora possui o genoma retroviral incorporado próximo ao proto-oncogene.
③
O vírus formado encapsula o proto-oncogene e o genoma viral.
Retrovírus com o proto-oncogene
Ciclos de infecção
④
A mutação cria o oncogene.
⑤ O retrovírus com o oncogene invade a célula normal.
Célula transformada, produzindo proteína regulatória defeituosa

Figura 13-36 – Conversão de um gene regulatório em um oncogene viral. ① Uma célula normal é infectada por um retrovírus (Capítulo 26), que ② insere seu próprio genoma dentro do cromossomo da célula hospedeira, próximo do gene para uma proteína regulatória (o proto-oncogene). ③ As partículas virais liberadas da célula infectada algumas vezes "capturam" um gene hospedeiro, neste caso um proto-oncogene. ④ Durante vários ciclos de infecção, ocorre uma mutação no proto-oncogene viral, convertendo-o em um oncogene. ⑤ Quando o vírus subseqüentemente infecta uma célula, ele introduz o oncogene dentro do DNA da célula. A transcrição do oncogene leva à produção de uma proteína regulatória defeituosa que continuamente oferece o sinal para a divisão celular, sobrepujando os mecanismos regulatórios normais. As células do hospedeiro infectadas com os vírus contendo o oncogene, portanto, sofrem uma divisão celular não regulada — elas formam tumores. Os proto-oncogenes podem também sofrer mutações em oncogenes sem a intervenção de um retrovírus, como descrito no texto.

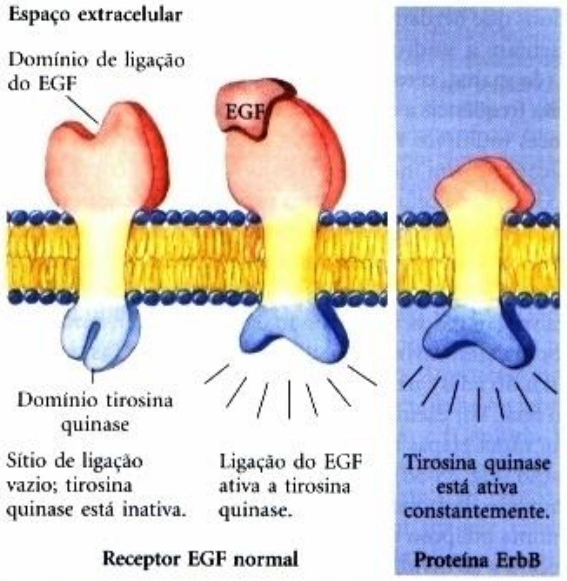

Espaço extracelular
Domínio de ligação do EGF
EGF
Domínio tirosina quinase
Sítio de ligação vazio; tirosina quinase está inativa.
Ligação do EGF ativa a tirosina quinase.
Tirosina quinase está ativa constantemente.
Receptor EGF normal
Proteína ErbB

Figura 13-37 – Oncogenes que codificam o receptor EGF defeituoso. O produto do oncogene *erb*B (a proteína ErbB) é uma versão truncada do receptor normal para o fator de crescimento epidérmico (EGF). Seu domínio intracelular possui a estrutura normalmente induzida pela ligação do EGF, entretanto, a proteína não possui o sítio de ligação extracelular para o EGF. Não regulada pelo EGF, a ErbB sinaliza continuamente para a divisão celular.

Defeitos em genes supressores de tumores removem as restrições normais na divisão celular

Os **genes supressores tumorais** codificam proteínas que normalmente restringem a divisão celular. Mutação em um ou mais desses genes pode levar à formação tumoral. O crescimento desregulado devido a genes supressores tumorais defeituosos, diferentemente daqueles devido aos oncogenes, é geralmente recessivo. Uma pessoa que herda uma cópia correta e uma cópia defeituosa não estará doente, mas cada célula no corpo dessa pessoa terá uma cópia defeituosa do gene. Se qualquer uma dessas 10^{12} células somáticas subseqüentemente possuir uma mutação na cópia boa, um tumor poderá crescer a partir daquela célula com dupla mutação. Mutações em ambas as cópias dos genes para pRb, p53 ou p21 produzirão células em que a restrição normal à divisão celular está ausente e termina com a formação tumoral.

O retinoblastoma é um câncer da retina que ocorre em crianças que possuem dois alelos *Rb* defeituosos. Crianças muito jovens que desenvolvem o retinoblastoma, comumente, possuem tumores múltiplos em ambos os olhos. Cada tumor é derivado de uma única célula da retina que tenha sofrido uma mutação na cópia boa do gene *Rb*. (Um feto com dois alelos mutantes em cada célula não é viável.) Pacientes com retinoblastoma também possuem uma alta incidência de cânceres de pulmão, próstata e mama.

Um evento bem menos comum é aquele de uma pessoa nascida com duas cópias boas de um gene que terá duas mutações independentes no *mesmo* gene, na *mesma* célula, mas isso ocorre. Alguns indivíduos desenvolvem retinoblastomas mais tarde na infância, usualmente com apenas um tumor em um dos olhos. Esses indivíduos presumivelmente nasceram com duas cópias boas do *Rb* em todas as células, mas tiveram mutações em ambos os genes *Rb* em uma única célula da retina, levando a um tumor.

Mutações no gene para a p53 também causam tumores; em mais de 90% dos carcinomas das células escamantes cutâneas humanas (cânceres de pele) e em cerca de 50% de todos os outros cânceres humanos, a *p53* está defeituosa. Casos raros de indivíduos que herdam uma cópia defeituosa da *p53* comumente apresentam a síndrome Li-Fraumeni, na qual cânceres múltiplos (da mama, cérebro, osso, sangue, pulmão e pele) ocorrem em alta freqüência e em uma idade precoce. A explicação para os tumores múltiplos nesses casos é a mesma explicação para as mutações *Rb*: um indivíduo nascido com uma cópia defeituosa da *p53* em cada célula somática provavelmente sofrerá uma segunda mutação na *p53*, em mais de uma célula na sua vida.

O efeito das mutações nos oncogenes e nos genes supressores tumorais não é uma resposta tudo ou nada. Em alguns cânceres, talvez em todos, a progressão de uma célula normal para um tumor maligno envolve o acúmulo de mutações (às vezes durante várias décadas), nenhuma das quais sozinha é responsável pelo efeito final. Por exemplo, o desenvolvimento do câncer colorretal possui várias etapas reconhecidas, cada uma associada com uma mutação (Fig. 13-38). Se uma célula epitelial normal no colo sofre mutação de ambas as cópias do gene supressor tumoral *APC* (adenoma poliposo do colo; "*a*denomatous *p*olyposis *c*oli"), ele começará a se dividir mais rápido do que as células normais e produzirá um clone de si próprio, um pólipo benigno (adenoma inicial). Por razões ainda não conhecidas, a mutação *APC* levará à instabilidade cromossômica, e regiões inteiras de um cromossomo são perdidas ou rearranjadas durante a divisão celular. Essa instabilidade pode levar a uma outra mutação, comumente em *ras*, que converte o clone em um adenoma intermediário. Uma terceira mutação (provavelmente no gene supressor tumoral *DCC*) leva ao adenoma final. Apenas quando ambas as cópias da *p53* se tornam defeituosas é que essa massa celular se tornará um carcinoma, um câncer maligno que coloca a vida em risco. A seqüência inteira, portanto, requer pelo menos sete "acertos" genéticos: dois em cada um dos três genes supressores tumorais (*APC*, DCC e *p53*) e um no proto-oncogene *ras*. Provavelmente, há vários outros caminhos para o câncer colorretal, entretanto, o princípio de que a malignidade máxima resulta apenas de mutações múltiplas, provavelmente, se manterá. Quando um pólipo for detectado na etapa de adenoma inicial e as células contendo as primeiras mutações forem removidas cirurgicamente, os adenomas tardios e os carcinomas não se desenvolverão, daí a importância da detecção inicial.

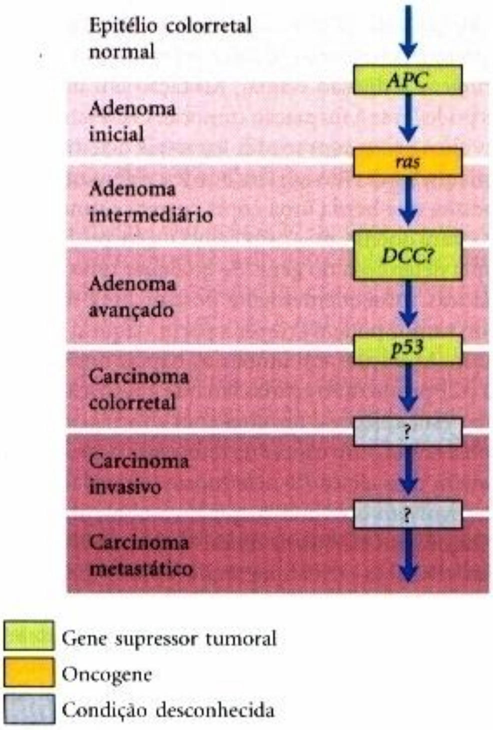


Figura 13-38 – Da célula epitelial normal para o câncer colorretal. No colo, mutações em ambas as cópias do gene supressor tumoral, *APC*, levam a agregados de células epiteliais benignas que se multiplicam muito rapidamente (adenoma inicial). Se uma célula já defeituosa no *APC* sofrer uma segunda mutação no proto-oncogene *ras*, a célula duplamente mutada dá origem a um adenoma intermediário, formando um pólipo benigno do colo. Quando uma dessas células sofre outras mutações nos genes supressores tumorais *DCC* (provavelmente) e *p53*, formam-se tumores progressivamente mais agressivos. Finalmente, mutações em genes ainda não caracterizados levam a um tumor maligno e finalmente a um tumor metastático que pode se espalhar para outros tecidos. A maioria dos tumores malignos é provavelmente o resultado de uma série de mutações como estas.

A apoptose é o suicídio celular programado

Muitas células podem controlar precisamente o tempo da sua própria morte pelo processo da **morte celular programada** ou **apoptose**. No desenvolvimento de um embrião, por exemplo, algumas células devem morrer. A formação dos dedos a partir das extremidades curtas e grossas dos membros envolve a morte de células, temporalmente precisa, entre os ossos dos dedos em desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, a partir de um ovo fecundado, exatamente 131 células (de um total de 1.090 células somáticas no embrião) devem sofrer morte programada a fim de construir o corpo adulto.

A apoptose também possui funções em processos outros que o desenvolvimento. Quando uma célula produtora de anticorpos estiver produzindo anticorpos contra um antígeno normalmente presente no corpo, esta célula sofrerá morte programada na glândula timo — um mecanismo essencial para a eliminação de anticorpos autodestruidores. A eliminação mensal de células da parede uterina (menstruação) é um outro caso de apoptose mediando a morte celular normal. Algumas vezes o suicídio celular não é programado, mas ocorre em resposta a circunstâncias biológicas que ameaçam o resto do organismo. Por exemplo, uma célula infectada por vírus, que morre antes de completar o ciclo infeccioso, previne a propagação do vírus para as células vizinhas. Vários estresses como calor, hiperosmolaridade, luz UV e irradiação gama também desencadeiam o suicídio celular, presumivelmente o organismo estará melhor com essas células mortas do que vivas e aberrantes.

Os mecanismos regulatórios que desencadeiam a apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular. O sinal para o suicídio freqüentemente provém do exterior, por meio do receptor da superfície. O fator de necrose tumoral (TNF), produzido pelas células do sistema imune, interage com as células por meio de receptores específicos para o TNF. Esses receptores possuem sítios de ligação ao TNF na face externa da membrana plasmática e um "domínio morte" de cerca de 80 resíduos de aminoácidos, que passa o sinal de autodestruição através da membrana às proteínas citosólicas como o TRADD (domínio morte associado ao receptor do TNF — "*TNF re*ceptor-*a*ssociated *d*eath *d*omain") (Fig. 13-39). Um outro receptor, Fas, possui um domínio morte semelhante que permite que ele interaja com a proteína citosólica FADD (domínio morte associado ao Fas — "*F*as-*a*ssociated *d*eath *d*omain"), que ativa uma protease citosólica chamada de caspase-8. Essa enzima pertence a uma família de proteases envolvidas na apoptose; todas são sintetizadas como proenzimas inativas, todas possuem um resíduo crítico de Cys no sítio ativo e todas hidrolisam suas proteínas-alvo no lado carboxiterminal de resíduos específicos de Asp.

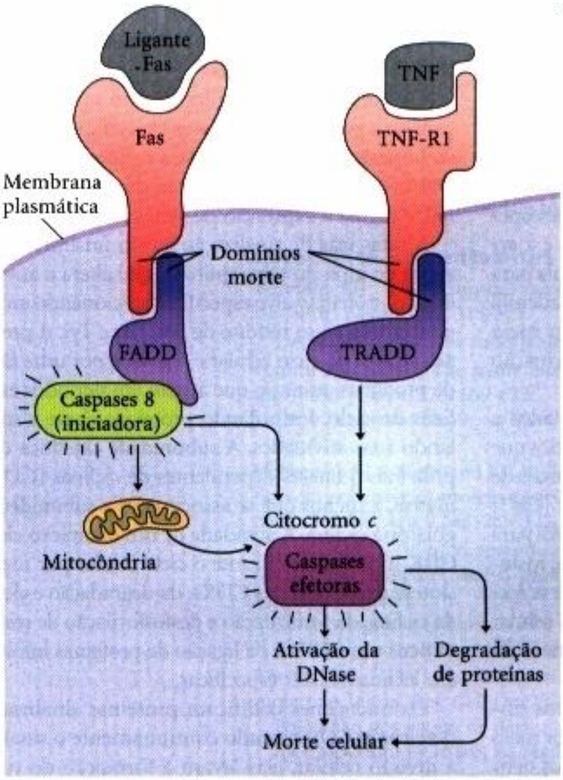


Figura 13-39 – Eventos iniciais da apoptose. Os receptores na membrana plasmática (Fas, TNF-RI) recebem sinais de fora da célula (o ligante Fas ou o fator de necrose tumoral (TNF), respectivamente). A ativação do receptor permite a interação entre o "domínio morte" (uma seqüência de 80 resíduos em Fas ou TNF-RI e um domínio morte semelhante nas proteínas citosólicas FADD ou TRADD. A FADD ativa uma protease citosólica chamada de caspase-8, que ativa proteoliticamente outras proteases celulares. A TRADD também ativa proteases. A proteólise resultante é o fator mais importante para a morte celular.

Quando a caspase-8, uma caspase "iniciadora", é ativada por um sinal apoptótico transportado por meio do FADD, ela se auto-ativa clivando sua própria forma de proenzima. As mitocôndrias são um dos alvos da caspase-8 ativa. A protease induz a liberação de certas proteínas encontradas entre as membranas mitocondriais interna e externa: citocromo *c* (Capítulo 19) e várias caspases "efetoras". O citocromo *c* liga-se à forma de proenzima da caspase efetora e estimula sua ativação proteolítica pela caspase-8. A caspase efetora ativa, por sua vez, catalisa a destruição generalizada das proteínas celulares, que é a principal causa da morte celular apoptótica. Uma ação-alvo específica da caspase é a DNase ativada pela caspase.

Os produtos monoméricos das degradações das proteínas e de DNA (aminoácidos e nucleotídeos) são liberados em um processo controlado que os permite ser captados e reutilizados pelas células vizinhas. A apoptose, dessa forma, permite ao organismo eliminar uma célula sem desperdiçar seus componentes.

Sumário

Todas as células possuem mecanismos de transdução de sinais específicos e altamente sensíveis, que têm sido conservados durante a evolução. Uma grande variedade de estímulos, incluindo hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento, atua por meio de receptores protéicos específicos na membrana plasmática. Os receptores ligam-se à molécula sinal, amplificam o sinal, integram-no com os vindos de outros receptores e transmitem-no para dentro da célula. Se o sinal persistir, a dessensibilização do receptor reduz ou termina a resposta. As células eucarióticas possuem quatro mecanismos de sinalização gerais: (1) canais iônicos na membrana plasmática; (2) enzimas com um domínio catalítico dentro da célula e um receptor extracelular para o sinal; (3) proteínas de membrana que estimulam proteínas-alvo específicas (enzimas ou canais iônicos) pela ativação de proteínas G; e (4) proteínas nucleares que se ligam a esteróides e atuam como fatores de transcrição.

Os canais iônicos abertos por ligantes ou potencial de membrana são centrais para a sinalização em neurônios e outras células. Os canais Na^+K^+ abertos por voltagem, das membranas neuronais, transportam o potencial de ação ao longo do axônio como uma onda de despolarização (influxo de Na^+) seguido pela repolarização (efluxo de K^+). A chegada de um potencial de ação desencadeia a liberação de um neurotransmissor da célula pré-sináptica. O neurotransmissor (acetilcolina, por exemplo) difunde-se à célula pós-sináptica, liga-se a receptores específicos na membrana plasmática e desencadeia uma alteração na V_m.

O receptor da insulina é o protótipo dos receptores enzimáticos com a atividade tirosina quinase. Quando a insulina se liga ao receptor, o domínio enzimático fosforila primeiro a si próprio e depois as outras proteínas-alvo em resíduos Tyr, criando um sítio de ligação para as proteínas com domínios SH2. Interações seqüenciais proteína-proteína finalmente terminam na ligação do GTP à proteína Ras, deslocando o GDP e ativando a Ras. A Ras, por sua vez, ativa uma cascata de proteína quinase que termina com a fosforilação de proteínas-alvo no citosol e no núcleo. O resultado são alterações metabólicas específicas e a alteração na expressão gênica.

O fator natriurético atrial liga-se a receptores enzimáticos com atividade guanilil ciclase. O cGMP produzido atua como um segundo mensageiro, ativando a proteína quinase dependente de cGMP (PKG). Essa enzima altera o metabolismo fosforilando enzimas-alvo específicas.

O receptor β-adrenérgico tipifica a grande família de receptores que possuem sete segmentos transmembrana e atuam por meio de proteínas G triméricas. Durante a ligação do ligante, esses receptores serpenteantes catalisam a troca para GTP, do GDP ligado a G_s. A ligação do GTP força a dissociação da subunidade α da G_s, e essa subunidade ativa a adenilil ciclase na membrana plasmática. O cAMP produzido é uma mensagem secundária intracelular que estimula a proteína quinase dependente de cAMP (PKA). A PKA medeia os efeitos da adrenalina fosforilando proteínas-chave nas vias metabólicas dos carboidratos e gorduras. Essa cascata de eventos, na qual uma única molécula de hormônio ativa um catalisador que por sua vez ativa um outro catalisador, e assim por diante, resulta em uma grande amplificação do sinal; essa é a característica de todos os sistemas ativados por hormônios. O mensageiro secundário é finalmente destruído pela fosfodiesterase do cAMP, e a G_s desliga-se pela hidrólise de seu GTP ligado, em GDP, terminando a resposta. Quando o sinal da adrenalina persiste, a ação de uma proteína quinase específica para o receptor β-adrenérgico (βARK) e a arrestina temporariamente dessensibilizam a célula para a adrenalina. Alguns receptores estimulam a adenilil ciclase por meio da G_s; outros inibem-na por meio da G_i. Assim, a [cAMP] celular reflete a informação integrada de dois (ou mais) sinais.

Alguns receptores serpenteantes são acoplados a uma fosfolipase C (PLP) da membrana plasmática que cliva PIP_2 em diacilglicerol e IP_3. Abrindo os canais de Ca^{2+} no retículo endoplasmático, o IP_3 eleva a $[Ca^{2+}]$ citosólica e o Ca^{2+} combina-se com o diacilglicerol para ativar a proteína quinase C (PKC). Essa enzima, fosforilando proteínas celulares específicas, produz a resposta da célula ao sinal extracelular. A $[Ca^{2+}]$ celular regula várias enzimas, freqüentemente por meio da proteína de ligação do Ca^{2+}, a calmodulina.

A visão, o olfato e a gustação nos vertebrados empregam receptores serpenteantes, que atuam por meio das proteínas G triméricas para alterar o V_m dos neurônios sensoriais. Nas células bastonetes e cones da retina, a luz ativa a rodopsina, que estimula a substituição do GDP pelo GTP na proteína G, a transducina. A subunidade α liberada da transducina ativa a fosfodiesterase cGMP, que então diminui a [cGMP] e assim fecha os canais iônicos dependentes de cGMP nos segmentos externos dos neurônios. A hiperpolarização resultante da célula bastonete ou cone transporta o sinal para o próximo neurônio na via, e finalmente ao cérebro. Nos neurônios olfativos, o estímulo atua por meio de receptores serpenteantes e proteínas G, desencadeando ou um aumento na [cAMP] (ativando a adenilil ciclase) ou um aumento na $[Ca^{2+}]$ (ativando a PLC). Esses mensageiros secundários afetam os canais iônicos e, portanto, a V_m. Os neurônios gustativos possuem receptores serpenteantes que respondem aos sabores elevando (doce) ou diminuindo (amargo) a [cAMP], que por sua vez altera o V_m abrindo os canais iônicos.

Os hormônios esteróides entram nas células e ligam-se a proteínas receptoras específicas. O complexo hormônio-receptor liga-se a regiões específicas do DNA, chamadas de elementos de resposta hormonal, e regula a expressão de genes na proximidade.

Muitas vias de sinalização levam finalmente à ativação de uma proteína quinase, que altera a atividade de suas proteínas-alvo específicas adicionando um grupo fosforila a um resíduo de Ser, Thr e Tyr. A progressão através do ciclo celular é regulada por uma família de proteínas quinases que atuam em períodos específicos do ciclo, fosforilando proteínas-chave e modulando suas atividades. A subunidade catalítica dessas proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) é inativa, a menos que se associe com a subunidade regulatória ciclina. A atividade de um complexo ciclina-CDK modifica-se durante o ciclo celular por meio da síntese diferencial das CDKs, da degradação específica da ciclina, da fosforilação e desfosforilação de resíduos críticos nas CDKs e da ligação de proteínas inibitórias em ciclinas-CDKs específicas.

Os oncogenes codificam proteínas sinalizadoras defeituosas. Oferecendo continuamente o sinal para a divisão celular, elas levam à formação do tumor. Os oncogenes são geneticamente dominantes e podem codificar fatores de crescimento, receptores, proteínas G, proteínas quinases ou reguladores nucleares da transcrição defeituosos. Os genes supressores tumorais codificam proteínas regulatórias que normalmente inibem a divisão celular; mutações nesses genes podem levar à formação de tumores, mas são geneticamente recessivas. O câncer geralmente é o resultado de um acúmulo de mutações nos oncogenes e nos genes supressores tumorais.

A apoptose (morte celular programada) envolve algumas proteínas que regulam o ciclo celular e outras únicas para a via da morte celular. Desencadeada por sinais externos como o fator de necrose tumoral ou por mecanismos internos, a apoptose termina na ativação de proteases que degradam as proteínas celulares.

Leitura Adicional

Receptores de canais iônicos

(Veja também Leituras Adicionais sobre os canais iônicos no Capítulo 12, em Transporte de solutos através das membranas.)

Aidley DJ & Stanfield PR. (1996) Ion Channels: Molecules in Action. *Cambridge University Press, Cambridge* **89**, 829-830.

Introdução clara e concisa da física, química e biologia molecular usada na pesquisa sobre canais iônicos, a ênfase está nas abordagens moleculares.

Changeux J-P. (1993) Chemical signaling in the brain. *Sci Am.* **269** (November), 58-62.

Descrição introdutória da estrutura e dos mecanismos de sinalização do receptor da acetilcolina.

Lehmann-Horn F & Jurkat-Rott K. (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* **79**, 1317-1372.

Revisão avançada da estrutura e função dos canais iônicos, com ênfase em casos nos quais os defeitos nos canais iônicos produzem doenças humanas.

Receptores enzimáticos

Foster DC, Wedel BJ, Robinson SW, & Garbers DL. (1999) Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**, 1-39.

Revisão avançada da estrutura e função da transdução de sinais das guanilil ciclases.

Fantl WJ, Johnson DE, & Williams LT. (1993) Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 453-481.

Schaeffer HJ & Weber MJ. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435-2444.

Revisão intermediária das MAPKs e bases para a sinalização específica através dessas proteínas de sinalização gerais.

Seger R & Krebs EG. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.

Revisão intermediária.

Shepherd PR, Whiters DJ, & Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* **333**, 471-490.

Revisão intermediária da importância da PKB e PI-3K na regulação metabólica pela insulina.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, & Johnson GL. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143-180.

Revisão avançada das funções da MAP quinase em diversos organismos, da levedura, fungo do lodo e nematóide até os vertebrados e plantas.

Receptores serpenteantes

Berridge MJ. (1993) Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**, 315-325.

Descrição clássica do sistema de sinalização por IP_3.

Hamm HE. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 669-672.

Introduz uma série de revisões curtas sobre as proteínas G.

Helmreich EJ & Hofmann KP. (1996) Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 285-322.

Lee AG (ed). (1996) *Biomembranes*, Vols 2A and 2B, *Rhodopsins, Receptors, and G-proteins*, JAI Press, Hampton Hill, England.

Doze artigos excelentes sobre os receptores serpenteantes e seus mecanismos de transdução.

Martin TFJ. (1998) Phosphoinositide lipids as signaling molecules. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 231-264.

Discussão dos papéis de derivados do fosfatidilinositol na transdução de sinais, na regulação do citoesqueleto e no transporte de membranas.

Skiba NP & Hamm HE. (1998) How $G_{s\alpha}$ activates adenylyl cyclase. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 88-92.

Revisão intermediária dos mecanismos de ação da proteína G, baseada em estudos estruturais.

Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, & Herman B. (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **79**, 1089-1125.

Revisão avançada dos métodos para estimar os níveis intracelulares do Ca^{2+} em tempo real.

Thomas AP, Bird GSJ, Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, & Putney JW Jr. (1996) Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* **10**, 1505-1517.

Visão, olfato e gustação

Baylor D. (1996) How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 560-565.

Uma das seis revisões curtas sobre a visão nesse fascículo da revista.

Herness MS & Gilbertson T. (1999) Cellular mechanisms of taste transduction. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 873-900.

Revisão avançada da gustação.

Mombaerts P. (1999) Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* **286**, 707-711.

Revisão intermediária dos transdutores olfativos nos vertebrados, nematóides e na mosca das frutas.

Nathans J. (1989) The genes for color vision. *Sci. Am.* **260** (February), 42-49.

Schild D & Restrepo D. (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfatory receptor cells. *Physiol. Rev.* **78**, 429-466.

Revisão avançada.

Scott K & Zuker C. (1997) Ligts out: deactivation of the phototransduction cascade. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 350-354.

Proteínas quinases e a fosforilação de proteínas

(Veja também Leituras Adicionais sobre a fosforilação de proteínas no Capítulo 8, em Enzimas regulatórias.)

Faux MC & Scott JD. (1996) More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 312-315.

Descrição do papel das proteínas-alvo em manter as proteínas quinases em seus sítios de ação.

Pinna LA & Ruzzene M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191-225.

Revisão avançada dos fatores, incluindo seqüências consenso, que dão às proteínas quinases a sua especificidade.

Roach PJ. (1991) Multisite and hiearchal protein phosphorylation *J. Biol. Chem.* **266**, 14.139-14.142.

Visão da importância dos múltiplos sítios de fosforilação na regulação da função da proteína.

Receptores e ação dos hormônios esteróides

Carson-Jurica MA, Schrader WT, & O'Malley BW. (1990) Sterooid receptor family – structure and functions. *Endoc. Rev.* 11, 201-220.

Discussão avançada da estrutura dos receptores dos hormônios esteróides e do mecanismo de sua ação.

Jordan VC. (1998) Designer estrogens. *Sci. Am.* (October), 60-67.

Revisão introdutória do mecanismo de ação e dos efeitos de compostos semelhantes ao estrógeno em medicina.

Ciclo celular e câncer

Cavenee WK & White RL. (1995) The genetic basis of cancer *Sci. Am.* **272** (March), 72-79.

Fearon ER. (1997) Human cancer syndromes — clues to the origin and nature of cancer. *Science* **278**, 1043-1050.

Revisão intermediária do papel das mutações herdadas no desenvolvimento do câncer.

Herwig S & Strauss M. (1997) The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **246**, 581-601.

Hunt M & Hunt T. (1993) *The Cell Cycle: An Introduction*. W.H. Freeman and Company/Oxford University Press, New York/Oxford.

King RW, Deshaies RJ, Peters JM, & Kirschner MW. (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652-1659.

Descrição de nível intermediário do papel da degradação dependente de ubiquitina das ciclinas na regulação do ciclo celular.

Kinzler KW & Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary coloretal cancer. *Cell* **87**, 159-170.

Evidência dos processos de etapas múltiplas no desenvolvimento do câncer.

Levine AJ. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.

Cobertura de nível intermediário da função da proteína p53 no ciclo celular normal e no câncer.

Morgan DO. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261-291.

Revisão avançada.

Weinberg RA. (1996) How cancer arises. *Sci. Am.* **275** (September), 62-70.

Apoptose

Anderson P. (1997) Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 33-46.

Ashkenazi A & Dixit VM. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.

Este e os trabalhos de Green e Reed e de Thornberry e Lazebnik (a seguir) estão em um número de *Science* dedicado à apoptose.

Duke RC, Ojcius DM, & Young JD-E. (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.* **275** (December), 80-87.

Green DR & Reed JC. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.

Jacobson MD, Weil M, & Raff MC. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

Thornberry NA & Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.

Problemas

1. Efeitos terapêuticos do albuterol. Os sintomas respiratórios da asma devem-se à constrição dos brônquios e dos bronquíolos dos pulmões devido à contração do músculo liso de suas paredes. Essa constrição pode ser revertida pela elevação da [cAMP] no músculo liso. Explique os efeitos terapêuticos do albuterol, um agonista β-adrenérgico, receitado (por inalação) para a asma. Você esperaria que essa droga tivesse qualquer efeito colateral? Como poderia se projetar uma droga melhor que não tivesse esses efeitos?

2. Amplificação dos sinais hormonais. Descreva todas as fontes de amplificação no sistema do receptor da insulina.

3. Término dos sinais hormonais. Os sinais transportados por hormônios devem finalmente terminar. Descreva vários mecanismos diferentes para a terminação do sinal.

4. Especificidade de um sinal para um tipo celular único. Discuta a validade da seguinte proposição: uma molécula de sinalização (hormônio, fator de crescimento ou neurotransmissor) induz a respostas idênticas em diferentes tipos de células-alvo se elas contiverem receptores idênticos.

5. Potencial de membrana de repouso. Uma variedade de invertebrados pouco usuais, incluindo moluscos gigantes, mexilhões e vermes poliquetas, vivem nas margens de correntes hidrotérmicas no fundo do oceano.

(a) O músculo adutor de um molusco gigante das profundidades do mar possui um potencial de membrana de repouso de –95mV. Conhecidas as composições iônicas intra e extracelulares, mostradas na tabela a seguir, você prediziria esse potencial de membrana? Por que sim ou não?

	Concentração (mM)	
Íon	**Intracelular**	**Extracelular**
Na^+	440	50
K^+	20	400
Cl^-	560	21
Ca^{2+}	10	0,4

(b) Assumindo que a membrana do músculo adutor seja permeável a apenas um dos íons listados na tabela, qual íon poderia determinar o V_m?

6. Potenciais de membrana nos ovos do sapo. A fertilização de um oócito do sapo por um espermatozóide desencadeia alterações iônicas semelhantes àquelas observadas nos neurônios (durante a movimentação dos potenciais de ação) e inicia os eventos que levam à divisão celular e o desenvolvimento do embrião. Oócitos podem ser estimulados a se dividir sem a fertilização, suspendendo-os em 80mM de KCl (a água de lago normal contém 9mM de KCl).

(a) Como a alteração na [KCl] extracelular afeta o potencial de membrana de repouso do oócito? (Dica: Assuma que o oócito contenha 120mM K^+ e seja permeável *apenas* ao K^+.) Assuma uma temperatura de 20°C.

(b) Quando o experimento for repetido em água sem Ca^{2+}, a [KCl] elevada não tem efeito. O que isso sugere sobre o mecanismo do efeito do KCl?

7. Excitação desencadeada pela hiperpolarização. Na maioria dos neurônios, a *despolarização* da membrana leva à abertura dos canais iônicos dependentes da voltagem, gerando um potencial de ação e finalmente um influxo de Ca^{2+}, que induz a liberação do neurotransmissor no terminal do axônio. Invente uma estratégia celular pela qual a *hiperpolarização* nas células bastonetes poderia produzir a excitação da via visual e a passagem dos sinais visuais ao cérebro. (Dica: A via de sinalização neuronal nos organismos superiores consiste de *uma série* de neurônios que transmitem informação ao cérebro (veja Fig. 13-20). O sinal liberado por um neurônio pode ser ou excitatório ou inibitório ao neurônio pós-sináptico seguinte.)

8. Experimentos hormonais em sistemas livres de células. Na década 1950, Earl W. Sutherland Jr. e colaboradores realizaram experimentos pioneiros para elucidar o mecanismo de ação da adrenalina e do glucagon. Considerando o que você aprendeu sobre a ação hormonal neste capítulo, interprete cada um dos experimentos descritos a seguir. Identifique a substância X e indique o significado dos resultados.

(a) A adição da adrenalina a um homogeneizado de fígado normal leva a um aumento na atividade da glicogênio fosforilase. Entretanto, se o homogeneizado for primeiro centrifugado a uma alta velocidade e a adrenalina e o glucagon forem adicionados à fração clara do sobrenadante que contém a fosforilase, nenhum aumento na atividade da fosforilase é observado.

(b) Quando a fração particulada da centrifugação em (a) era tratada com adrenalina, produzia-se uma substância X. A substância foi isolada e purificada. Diferentemente da adrenalina, a substância X, quando adicionada à fração clara do sobrenadante do homogeneizado centrifugado, ativava a glicogênio fosforilase.

(c) A substância X era termoestável, ou seja, o tratamento com o calor não afetava sua capacidade de ativar a fosforilase. (Dica: Seria esse o caso se a substância X fosse uma proteína?) A substância X era praticamente idêntica a um composto obtido quando o ATP puro era tratado com o hidróxido de bário. (A Fig. 10-6 será útil.)

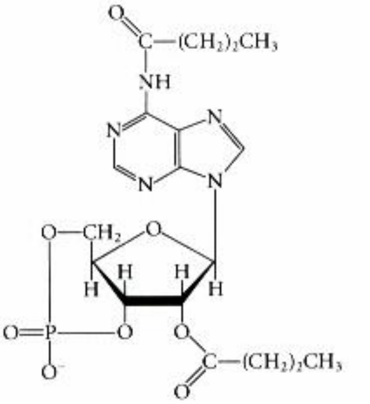
9. Efeito da toxina da cólera na adenilil ciclase. A bactéria gram-negativa *Vibrio cholerae* produz uma proteína, a toxina da cólera (M_r 90.000), que é responsável pelos sintomas característicos da cólera: perda excessiva da água corporal e Na^+ por uma contínua e debilitante diarréia. Se os fluidos corporais e o Na^+ não forem substituídos, ocorre uma desidratação grave; não tratada a doença freqüentemente é fatal. Quando a toxina da cólera ganha acesso ao trato intestinal humano, ela se liga fortemente a sítios específicos na membrana plasmática das células epiteliais que cobrem o intestino delgado, causando uma prolongada ativação na adenilil ciclase (horas ou dias).

(a) Qual é o efeito da toxina da cólera na [cAMP] nas células do intestino?

(b) Baseando-se na informação citada, sugira como o cAMP funciona normalmente nas células epiteliais do intestino.

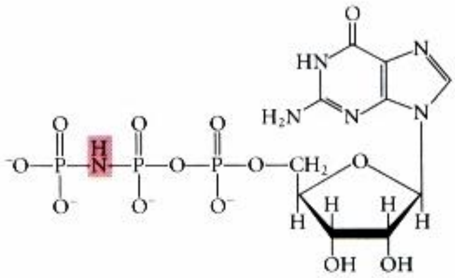
(c) Sugira um possível tratamento da cólera.

10. Efeito do dibutil cAMP *versus* o cAMP em células intactas. Os efeitos fisiológicos da adrenalina deveriam em princípio ser mimetizados pela adição do cAMP às células-alvo. Na prática, a adição do cAMP às células intactas induz apenas uma resposta fisiológica mínima. Por quê? Quando o derivativo, estruturalmente relacionado, dibutiril cAMP (mostrado a seguir) é adicionado às células intactas, a resposta fisiológica esperada é prontamente visível. Explique a base da diferença na resposta celular para essas duas substâncias. O dibutiril cAMP é largamente usado em estudos da função do cAMP.



Dibutiril-cAMP
(N^6,$O^{2'}$-Dibutiril-adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico)

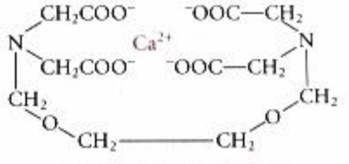
11. Análogos do GTP não hidrolisáveis. Muitas enzimas podem hidrolisar o GTP entre os fosfatos β e γ. O análogo do GTP β,γ-imidoguanosina 5'-trifosfato Gpp(NH)p, mostrado a seguir, não consegue ser hidrolisado entre os fosfatos β e γ. Prediga o efeito da microinjeção do Gpp(NH)p dentro de um miócito na resposta celular à estimulação β-adrenérgica.



Gpp(NH)p
β,γ-Imidogranosina 5'-trifosfato

12. Diferenças nas proteínas G. Compare as proteínas G, G, que age na transdução do sinal entre o receptor β-adrenérgico e Ras. Que propriedades elas compartilham? Como elas diferem? Qual a diferença funcional entre G_s e G_i?

13. Injeção de EGTA. O EGTA (*e*tileno *g*licol-bis-(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-*t*etraacético *á*cido) é um agente quelante com alta afinidade e especificidade para o Ca^{2+}. Microinjetando uma célula com uma solução apropriada de Ca^{2+}-EDTA, um experimentador pode impedir que a [Ca^{2+}] citosólica se eleve acima de 10^{-7}M. Como poderia a microinjeção de EGTA afetar a resposta celular à vasopressina (veja Tabela 13-5)?



EGTA (com Ca^{2+} ligado)
(Etileno glico-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético ácido)

14. Dessensibilização visual. A doença de Oguchi é uma forma herdável de cegueira noturna. Os indivíduos afetados recuperam a visão lentamente depois de um "flash" de luz brilhante contra um fundo preto, como a luz de um carro na estrada. Sugira qual poderia ser o defeito molecular na doença de Oguchi. Explique em termos moleculares como esse defeito explica a cegueira noturna.

15. Mutações na PKA. Explique como mutações na subunidade R ou C da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) poderia levar a (a) uma PKA constantemente ativa ou (b) uma PKA constantemente inativa.

16. Mecanismos para a regulação das proteínas quinases. Identifique oito tipos gerais de proteínas quinases encontradas em células eucarióticas e explique qual fator é *diretamente* responsável para ativar cada tipo.

17. Mutações nos genes supressores tumorais e nos oncogenes. Explique por que as mutações nos genes supressores tumorais são recessivas (ambas as cópias do gene devem ser defeituosas para a regulação da divisão celular ser defeituosa) enquanto as mutações nos oncogenes são dominantes.

18. Retinoblastoma em crianças. Explique por que algumas crianças com retinoblastoma desenvolvem tumores múltiplos da retina em ambos os olhos, enquanto outras possuem um único tumor em apenas um olho.

19. Mutações em *ras*. Como uma mutação no gene *ras* que leva a uma proteína Ras sem atividade GTPase afeta a resposta celular à insulina?

CAPÍTULO 14

Princípios de Bioenergética

As células e os organismos precisam realizar trabalho para se manterem vivos, crescerem e reproduzirem. A habilidade para aproveitar a energia, direcionando-a na forma de trabalho biológico, é uma propriedade fundamental de todas as células e organismos vivos, aparentemente adquirida muito cedo no curso da evolução celular. Os organismos atuais executam uma notável variedade de processos de transformação de energia, convertendo uma forma de energia em outra. Eles utilizam a energia química contida nos combustíveis para sintetizar, a partir de precursores simples, moléculas complexas e altamente organizadas. Eles também convertem a energia química dos combustíveis em gradientes de concentração e elétrico, em movimento e calor e, em alguns organismos tais como o vaga-lume e peixes do fundo do mar, em luz. Os organismos fotossintéticos transformam a energia luminosa em todas essas outras formas de energia.

Os mecanismos químicos envolvidos nos processos de transformação da energia biológica por séculos têm fascinado e desafiado os biologistas. Antoine Lavoisier, decapitado durante a Revolução Francesa, reconheceu que de alguma forma os animais transformam combustíveis químicos (alimentos) em calor e que esse processo de respiração é essencial para a vida. Ele relatou o seguinte:

> ". . . em geral, a respiração nada mais é do que uma combustão lenta de carbono e hidrogênio, semelhante à que ocorre em uma lâmpada ou vela acesa, e assim, sob este ponto de vista, os animais que respiram são verdadeiros corpos combustíveis que queimam e consomem a si próprios. . . Alguém poderia dizer que esta analogia entre combustão e respiração não passou despercebida aos poetas, ou melhor, aos filósofos da Antiguidade, já tendo sido por eles relatada e interpretada: Este fogo roubado dos céus, esta tocha de Prometeu, não representa apenas uma idéia poética e engenhosa, mas antes, ao menos para os animais que respiram, ela é uma representação fiel das operações da natureza. Portanto, em conformidade com os antigos, pode-se dizer que a tocha da vida inflama-se a si mesma no momento em que a criança respira pela primeira vez, não se extinguindo a não ser na morte"*.

Antoine Lavoisier
(1743-1794)

No decorrer do século XX, estudos bioquímicos revelaram a maior parte da química associada àquela "tocha da vida". As transformações de energia biológica obedecem às mesmas leis físicas que determinam os demais processos naturais. É, portanto, essencial para um estudante de bioquímica entender essas leis e como elas se aplicam ao fluxo de energia na biosfera. Neste capítulo, serão inicialmente revistas as leis da termodinâmica, bem como as relações quantitativas entre energia livre, entalpia e entropia. Será então discutida a função especial do ATP nas trocas de energia biológica. Finalmente, será discutida a importância das reações de oxidação-redução nas células vivas, a energética das reações de transferência de elétrons, além dos transportadores de elétrons freqüentemente utilizados como co-fatores das enzimas que catalisam essas reações.

Bioenergética e Termodinâmica

Bioenergética é o estudo quantitativo das transformações de energia que ocorrem nas células vivas, bem como da natureza e função dos processos químicos nelas envolvidos. Embora muitos dos princípios da termodinâmica tenham sido previamente apresentados, podendo assim já ser familiares, uma revisão dos aspectos quantitativos desses princípios será útil no presente contexto.

As transformações biológicas de energia seguem as leis da termodinâmica

Diversas observações quantitativas de físicos e químicos sobre a interconversão das diferentes formas de energia conduziram, ainda no século XIX, à formulação das duas leis fundamentais da termodinâmica. A primeira lei é o princípio da conservação de energia: *para qualquer transformação física ou química, a quantidade total de energia no universo permanece constante; a energia pode mudar de forma ou ser transportada de uma região para outra; entretanto, ela não pode ser criada ou destruída.* A segunda lei da termodinâmica, que pode ser enunciada de diferentes formas, refere-se à tendência que o universo apresenta para uma desordem crescente: *em todos os processos naturais, a entropia do universo aumenta.*

Os organismos vivos consistem em conjuntos de moléculas cujo grau de organização é muito maior do que o dos componentes de seu meio ambiente, com os quais elas são formadas; eles produzem ordem e a mantêm, aparentemente ignorando a segunda lei da termodinâmica. Entretanto, além de os organismos vivos não violarem a segunda lei, eles operam em estrita concordância com ela. Para discutir a aplicação da segunda lei da termodinâmica aos sistemas biológicos, devem-se inicialmente definir esses sistemas e os meios em que eles se encontram. O sistema reagente é o conjunto de matéria que está sofrendo um processo físico ou químico particular, podendo ser um organismo, uma célula, ou ainda dois compostos reagentes. Juntos, o

---

*De uma publicação por Armand Seguin e Antoine Lavoisier, de 1789, citada em Lavoisier, A. (1862) *Oeuvres de Lavoisier*, Imprimerie Impériale, Paris.

FATOS
DA
VIDA
S.Harris

"Agora, na *segunda* lei da termodinâmica..."

sistema reagente e o seu meio ambiente constituem o universo. Em laboratório, alguns processos físicos ou químicos podem ocorrer em sistemas fechados ou isolados, sem qualquer troca de matéria ou energia com o meio ambiente. As células e os organismos vivos, entretanto, constituem sistemas abertos, trocando tanto matéria quanto energia com o ambiente, com o qual jamais atingem o equilíbrio. Assim, a constante interação entre sistema e ambiente explica como os organismos podem criar ordem interna, ao mesmo tempo em que operam de acordo com a segunda lei da termodinâmica.

No início deste texto foram definidos três parâmetros termodinâmicos que descrevem as transformações de energia que ocorrem durante uma reação química. A energia livre de Gibbs (G) expressa a quantidade de energia capaz de realizar trabalho durante uma reação a uma temperatura e pressão constantes (pág. 8). Quando uma reação ocorre com liberação de energia livre, ou seja, quando o sistema se transforma de modo a possuir menos energia livre, a variação de energia livre, ΔG, apresenta valor negativo, sendo a reação denominada exergônica. Nas reações endergônicas, o sistema ganha energia livre, sendo o valor de ΔG positivo. A entalpia, H, é o conteúdo de calor do sistema reagente. Ela reflete o número e os tipos de ligações químicas nos reagentes e produtos. Quando uma reação química libera calor, ela é denominada exotérmica: o conteúdo de calor dos produtos é menor do que o dos reagentes e ΔH possui, por convenção, um valor negativo. Sistemas reagentes que captam calor de seus ambientes possuem valores de ΔH positivos, sendo denominados endotérmicos (pág. 50). A entropia, S, é uma expressão quantitativa da casualidade ou desordem de um sistema (Adendo 14-1). Quando os produtos de uma reação são menos complexos e mais desordenados do que os reagentes, a reação ocorre com um ganho em entropia (pág. 56). As unidades de ΔG e ΔH são joules/mol ou calorias/mol (lembre-se de que uma caloria equivale a 4,184J); a unidade de entropia é joules/mol · grau Kelvin (J/mol · K) (Tabela 14-1).

Sob as condições existentes nos sistemas biológicos, incluindo temperatura e pressão constantes, as mudanças na energia livre, entalpia e entropia, estão quantitativamente relacionadas entre si pela equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \qquad (14\text{-}1)$$

na qual ΔG é a variação na energia livre de Gibbs do sistema reagente, ΔH é a variação na entalpia do sistema, T é a temperatura absoluta e ΔS é a variação na entropia do sistema. Por convenção, ΔS possui sinal positivo quando a entropia aumenta, e ΔH, conforme mencionado acima, possui sinal negativo quando é liberado calor do sistema para o ambiente. Quaisquer umas dessas condições, que são típicas de processos favoráveis, tendem a tornar o valor de ΔG negativo. De fato, o valor de ΔG para um sistema que reage espontaneamente é sempre negativo.

Tabela 14-1 – Algumas constantes físicas e unidades utilizadas em termodinâmica

Constante de Boltzmann, $\mathbf{k} = 1{,}381 \times 10^{-23}$J/K
Número de Avogadro, $N = 6{,}022 \times 10^{23}$mol^{-1}
Constante de Faraday, $\mathcal{F} = 96{,}480$J/V · mol
Constante dos gases, $R = 8{,}315$J/mol · K
(= 1,987cal/mol · K)

A unidade de ΔG e ΔH é J/mol (ou cal/mol)
A unidade de ΔS é J/mol · K (ou cal/mol · K)
1 cal = 4,184J

A unidade de temperatura absoluta, T, é Kelvin, K
25°C = 298K
A 25°C, RT = 2,479kJ/mol
(= 0,592kcal/mol)

A segunda lei da termodinâmica refere-se ao aumento na entropia *do universo* durante todos os processos físicos e químicos, embora esse aumento não ocorra necessariamente *no próprio sistema reagente*. A ordem produzida dentro das células à medida que elas crescem e se dividem é mais do que compensada pela desordem que elas criam em seus ambientes no curso desses acontecimentos (Adendo 14-1, caso 2). Em resumo, os organismos vivos preservam a ordem interna pela captação de energia livre do ambiente nas formas de nutrientes ou luz solar, devolvendo a ele uma quantidade igual de energia nas formas de calor e entropia.

As células necessitam de fontes de energia livre

As células são sistemas isotérmicos, ou seja, elas funcionam essencialmente em temperatura (e pressão) constante. O fluxo de calor não é uma fonte de energia para as células porque o calor é capaz de realizar trabalho somente quando ele passa para uma região ou objeto com temperatura mais baixa. A energia que as células podem, e devem, utilizar é a energia livre, expressa pela energia livre de Gibbs, função G, que permite predizer o sentido das reações químicas, a sua exata posição de equilíbrio e a quantidade de trabalho que elas podem teoricamente realizar em temperatura e pressão constantes. As células heterotróficas obtêm energia livre das moléculas nutrientes e as células fotossintéticas a obtêm da radiação solar absorvida. Ambos os tipos de células transformam essa energia livre em ATP e outros compostos ricos em energia, todos eles capazes de fornecer energia para a realização de trabalho biológico à temperatura constante.

A variação de energia livre padrão está diretamente relacionada com a constante de equilíbrio

A composição de um sistema reagente (uma mistura de reagentes químicos e seus produtos) tende a variar até que o equilíbrio químico seja atingido. Nas concentrações de equilíbrio, a velocidade da reação no sentido dos produtos é exatamente igual à velocidade no sentido dos reagentes, não ocorrendo no sistema qualquer mudança adicional. As concentrações dos reagentes e produtos *no estado de equilíbrio* definem a constante de equilíbrio, K_{eq} (pág. 74). Na reação geral: $a\mathrm{A} + b\mathrm{B} \rightleftharpoons c\mathrm{C} + d\mathrm{D}$, onde a, b, c, e d correspondem ao número de moléculas de A, B, C e D que participam da reação, a constante de equilíbrio é dada por:

$$K_{eq} = \frac{[\mathrm{C}]^c[\mathrm{D}]^d}{[\mathrm{A}]^a[\mathrm{B}]^b} \qquad (14\text{-}2)$$

onde [A], [B], [C] e [D] correspondem às concentrações molares dos componentes da reação no ponto de equilíbrio.

Adendo 14-1 Entropia: as vantagens de haver desorganização

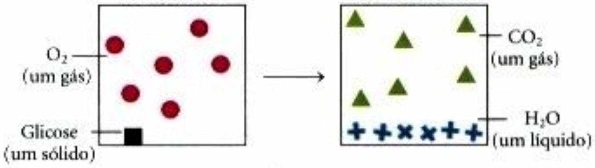
O termo entropia, que literalmente significa "mudança interior", foi utilizado pela primeira vez em 1851 por Rudolf Clausius, um dos formuladores da segunda lei da termodinâmica. Uma definição quantitativa rigorosa de entropia envolve considerações estatísticas e de probabilidades. Entretanto, a sua natureza pode ser ilustrada qualitativamente por três exemplos simples, cada um deles demonstrando um aspecto da entropia. A entropia está associada aos conceitos *casualidade* e *desordem*, manifestados de diferentes formas.

Caso 1: O bule de chá e a distribuição casual do calor. Sabe-se que o vapor gerado pela água fervente pode realizar trabalho útil. Mas suponhamos que a chama que aqueceu a 100°C a água contida em um bule de chá (o "sistema") existente em uma cozinha (o "ambiente") foi apagada e o bule começa a esfriar. Nenhum trabalho é realizado à medida que o bule e seu conteúdo esfriam, mas o calor passa deles para o "ambiente" (a cozinha), aumentando sua temperatura em um valor infinitesimalmente pequeno, até que o completo equilíbrio seja atingido. Nesse momento, todos os pontos do bule e da cozinha estarão precisamente com a mesma temperatura. A energia livre que estava concentrada no bule de água quente a 100°C, potencialmente capaz de realizar trabalho, desapareceu. Seu equivalente em energia calorífica ainda está presente no conjunto bule + cozinha, isto é, no "universo", porém com uma distribuição completamente ao acaso. Essa energia não é mais viável para a realização de trabalho, uma vez que não existe diferença de temperatura dentro da cozinha. Além disso, o aumento na entropia da cozinha (o "ambiente") é irreversível. Sabe-se pela experiência diária que o calor jamais voltaria espontaneamente da cozinha para o bule para aumentar novamente a temperatura da água a 100°C.

Caso 2: A oxidação da glicose. A entropia é um estado ou condição não apenas da energia, mas também da matéria. Os organismos aeróbicos (heterotróficos) extraem energia livre da glicose obtida do ambiente por meio de sua oxidação pelo oxigênio molecular, também obtido do ambiente. Os produtos finais desse metabolismo oxidativo, CO_2 e H_2O, são devolvidos ao ambiente. Nesse processo, o ambiente sofre aumento de entropia, enquanto o organismo permanece em estado estacionário, não sofrendo alterações em sua ordem interna. Embora uma parte da entropia tenha origem na dissipação de calor, a outra parte provém de um outro tipo de desordem, ilustrado pela equação para a oxidação da glicose:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

Isso pode ser representado esquematicamente como



Os átomos contidos em 1 molécula de glicose mais 6 moléculas de oxigênio, um total de 7 moléculas, são dispersos mais ao acaso devido à reação de oxidação, resultando em um total de 12 moléculas presentes ($6CO_2 + 6H_2O$).

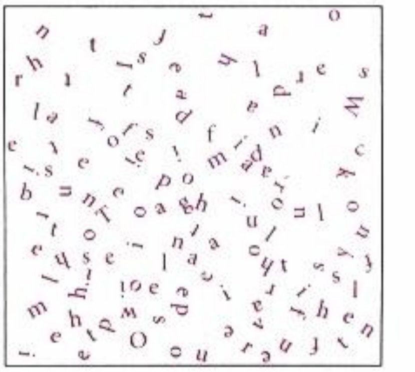
Sempre que uma reação química resulta no aumento do número de moléculas, ou ainda quando uma substância sólida é convertida em produtos líquidos ou gasosos, cujas moléculas apresentam maior liberdade de movimentação, a desordem molecular, e portanto a entropia, aumenta.

Caso 3: Informação e entropia. A pequena passagem descrita a seguir, extraída da peça *Julius Caesar*, Ato IV, Cena 3, é dita por Brutus antes de enfrentar o exército de Marco Antônio. São 125 letras do alfabeto inglês, que formam um arranjo não casual e rico em informação:

> **"There is a tide in the affairs of men,**
> **Which, taken at the flood, leads on to fortune;**
> **Omitted, all the voyage of their life**
> **Is bound in shallows and in miseries."**

Além do que estes versos expressam diretamente, existem muitos outros significados implícitos. Essa passagem reflete não apenas uma complexa seqüência de acontecimentos na peça, mas também faz eco às idéias nela discutidas, referentes a conflito, ambição e preço da liderança. Em associação com as idéias de Shakespeare sobre a natureza humana, ela é muito rica em informação.

Entretanto, se as 125 letras que compõem a citação fossem agrupadas em uma forma completamente casual e caótica, conforme mostrada a seguir, elas seriam desprovidas de qualquer significado.



Nesta distribuição, as 125 letras contêm pouca ou nenhuma informação, mas elas são muito ricas em entropia. Considerações desse tipo possibilitaram concluir que a informação é uma forma de energia, tendo sido denominada "entropia negativa". De fato, o ramo da matemática denominado teoria da informação, que é básico para a programação lógica de computadores, é fortemente relacionado à teoria termodinâmica. Os organismos vivos são estruturas altamente ordenadas, não casuais, imensamente ricas em informação e, portanto, pobres em entropia.

Quando um sistema reagente não se encontra no estado de equilíbrio, a tendência para um deslocamento em direção a ele corresponde a uma força impulsora, cuja intensidade pode ser expressa como a variação de energia livre para a reação, ΔG. Sob condições-padrão (298K = 25°C), quando reagentes e produtos estão presentes inicialmente em concentrações iguais a 1M ou, para os gases, em pressões parciais iguais a 101,3 quilopascals (kPa) ou 1 atm, a força impulsora do sistema em direção ao equilíbrio é definida como a variação de energia livre padrão, ΔG°. Por essa definição, a condição-padrão para reações que envolvem íons hidrogênio é $[H^+] = 1M$, o que corresponde a pH 0. Entretanto, a maioria das reações bioquímicas ocorre em soluções aquosas devidamente tamponadas em valores de pH próximos a 7; tanto o valor de pH quanto a concentração da água (55,5M) são essencialmente constantes. Para facilitar os cálculos, os bioquímicos definem um estado-padrão diferente, no qual a concentração de H^+ é 10^{-7}M (pH 7) e a concentração da água é 55,5M; para reações que envolvem o Mg^{2+}, inclusive a maioria das reações nas quais o ATP é substrato, a sua concentração em solução é geralmente considerada constante em 1mM. As constantes físicas com fundamento nesse estado-padrão bioquímico são denominadas **constantes-padrão transformadas**, sendo representadas com a inclusão de um apóstrofe (por exemplo, $\Delta G'^{\circ}$ e K'_{eq}) para distingui-las das constantes não transformadas utilizadas por físicos e químicos. (Observe que o símbolo $\Delta G'^{\circ}$ substitui o símbolo $\Delta G^{\circ\prime}$ utilizado em edições anteriores deste livro e na maioria de outros livros-texto. A alteração, recomendada por um comitê internacional de químicos e bioquímicos, visa a ressaltar que a energia livre transformada, G', é o critério para o equilíbrio.) Por convenção, quando H_2O, H^+ ou Mg^{2+} estão presentes em um sistema como reagentes ou produtos, as suas concentrações não são incluídas em equações como a Equação 14-2, embora estejam incorporadas nas constantes $\Delta G'^{\circ}$ e K'_{eq}.

Assim como a K'_{eq} é uma constante física característica para cada reação, $\Delta G'^{\circ}$ também é uma constante. Conforme foi mencionado no Capítulo 8 (Eq. 8-3, pág. 193), existe uma relação simples entre K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$:

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ \ln K'_{eq}$$

A variação de energia livre padrão de uma reação química é simplesmente uma via matemática alternativa para expressar a sua constante de equilíbrio. A Tabela 14-2 mostra a relação entre $\Delta G'^{\circ}$ e K'_{eq}. Se a constante de equilíbrio para uma determinada reação química (K'_{eq}) for igual a 1,0, a variação de energia livre padrão ($\Delta G'^{\circ}$) da reação será igual a 0,0 (o logaritmo natural de 1,0 é zero). Se a K'_{eq} for maior que 1,0, $\Delta G'^{\circ}$ terá valor negativo. Se a K'_{eq} for menor que 1,0, $\Delta G'^{\circ}$ terá valor positivo. Como a relação entre $\Delta G'^{\circ}$ e K'_{eq} é exponencial, variações relativamente pequenas no valor de $\Delta G'^{\circ}$ correspondem a grandes variações na K'_{eq}.

Tabela 14-2 – Relação entre constantes de equilíbrio e variações de energia livre padrão das reações químicas

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta G'^{\circ}$ (kcal/mol)*
10^3	−17,1	−4,1
10^2	−11,4	−2,7
10^1	−5,7	−1,4
1	0,0	0,0
10^{-1}	5,7	1,4
10^{-2}	11,4	2,7
10^{-3}	17,1	4,1
10^{-4}	22,8	5,5
10^{-5}	28,5	6,8
10^{-6}	34,2	8,2

*Embora joules e quilojoules sejam as unidades-padrão de energia utilizadas neste texto, os bioquímicos às vezes expressam valores de $\Delta G'^{\circ}$ em quilocalorias por mol. Portanto, foram incluídos nesta tabela valores tanto em quilojoules quanto em quilocalorias, assim como nas Tabelas 14-4 e 14-6. Para converter quilojoules em quilocalorias, basta dividir o valor em quilojoules por 4,184.

Uma interpretação alternativa para a variação de energia livre padrão é a de que, sob condições-padrão, $\Delta G'^{\circ}$ é a diferença entre o conteúdo de energia livre dos produtos e o conteúdo de energia livre dos reagentes. Quando o valor de $\Delta G'^{\circ}$ é negativo, os produtos possuem menos energia livre do que os reagentes e a reação ocorre espontaneamente sob condições-padrão; todas as reações químicas tendem a ocorrer no sentido que resulta em diminuição da energia livre do sistema. Um valor positivo de $\Delta G'^{\circ}$ significa que os produtos da reação possuem mais energia livre do que os reagentes; nesse caso, a reação tenderá a ocorrer no sentido reverso, caso seja iniciada com todos os componentes presentes em concentrações 1,0M (condições-padrão). A Tabela 14-3 resume esses aspectos.

Tabela 14-3 – Relação entre os valores de K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$ e o sentido das reações químicas sob condições-padrão

Quando K'_{eq} é	$\Delta G'^{\circ}$ é	Iniciando com componentes 1M a reação
> 1,0	Negativa	Ocorre de forma direta
1,0	Zero	Está em equilíbrio
< 1,0	Positiva	Ocorre de forma inversa

Como exemplo, será apresentado um cálculo simples da variação de energia livre padrão para a reação catalisada pela fosfoglicomutase:

$$\text{Glicose-1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose-6-fosfato}$$

A análise química mostra que se a reação for iniciada com 20mM de glicose-1-fosfato (na ausência de glicose-6-fosfato) ou com 20mM de glicose-6-fosfato (na ausência de glicose-1-fosfato), a 25°C e pH 7,0, no equilíbrio final estarão presentes 1mM de glicose-1-fosfato e 19mM de glicose-6-fosfato. (Lembre-se de que as enzimas não interferem no ponto de equilíbrio de uma reação; elas simplesmente aceleram a velocidade com que ele é atingido.) Dos dados apresentados, pode-se calcular a constante de equilíbrio:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{glicose-1-fosfato}]} = \frac{19\text{mM}}{1\text{mM}} = 19$$

A partir deste valor da K'_{eq}, pode-se calcular a variação de energia livre padrão:

$$\begin{aligned} \Delta G'^{\circ} &= -RT \ \ln K'_{eq} \\ &= -(8{,}315\text{J/mol} \cdot \text{K})(298\text{K})(\ln 19) \\ &= -7{,}296\text{J/mol} = -7{,}3\text{kJ/mol} \end{aligned}$$

Como a variação de energia livre padrão é negativa, quando a reação é iniciada com glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato, ambos os compostos em concentração 1,0M, a conversão do primeiro no segundo dá-se com perda (liberação) de energia livre. Para a reação reversa (a conversão de glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato), $\Delta G'^{\circ}$ apresenta valor equivalente, porém com sinal oposto.

A Tabela 14-4 apresenta as variações de energia livre padrão para algumas reações químicas representativas. Observar que a hidrólise de ésteres simples, amidas, peptídeos e glicosídeos, bem como reações envolvendo rearranjos e eliminações, ocorrem com variações relativamente pequenas na energia livre padrão, enquanto a hidrólise de anidridos de ácidos ocorre com diminuições relativamente elevadas. A oxidação completa de compostos orgânicos tais como glicose e palmitato a CO_2 e H_2O, rea-

Tabela 14-4 – Variações da energia livre padrão de algumas reações químicas em pH 7,0, a 25°C (298K)

Tipo de reação	$\Delta G'^{\circ}$	
	(kJ/mol)	(kcal/mol)
Reações de hidrólise		
Anidridos de ácidos		
Anidrido acético + H_2O ⟶ 2 acetato	–91,1	–21,8
ATP + H_2O ⟶ ADP + P_i	–30,5	–7,3
ATP + H_2O ⟶ AMP + PP_i	–45,6	–10,9
PP_i + H_2O ⟶ $2P_i$	–19,2	–4,6
UDP-glicose + H_2O ⟶ UMP + glicose-1-fosfato	–43,0	–10,3
Ésteres		
Acetato de etila + H_2O ⟶ etanol + acetato	–19,6	–4,7
Glicose-6-fosfato + H_2O ⟶ glicose + P_i	–13,8	–3,3
Amidas e peptídeos		
Glutamina + H_2O ⟶ glutamato + NH_4^+	–14,2	–3,4
Glicilglicina + H_2O ⟶ 2 glicina	–9,2	–2,2
Glicosídeos		
Maltose + H_2O ⟶ 2 glicose	–15,5	–3,7
Lactose + H_2O ⟶ glicose + galactose	–15,9	–3,8
Rearranjos		
Glicose-1-fosfato ⟶ glicose-6-fosfato	–7,3	–1,7
Frutose-6-fosfato ⟶ glicose-6-fosfato	–1,7	–0,4
Eliminação de água		
Malato ⟶ fumarato + H_2O	3,1	0,8
Oxidações com oxigênio molecular		
Glicose + $6O_2$ ⟶ $6CO_2$ + $6H_2O$	–2.840	–686
Palmitato + $23O_2$ ⟶ $16CO_2$ + $16H_2O$	–9.770	–2.338

ções que nas células incluem várias etapas, resulta em uma grande diminuição na energia livre padrão. As variações na energia livre padrão tais como as apresentadas na Tabela 14-4 indicam a quantidade de energia livre disponível para uma determinada reação, sob *condições-padrão*. Para as condições existentes nas células, entretanto, a expressão pertinente é a variação de energia livre *real*.

A variação de energia livre *real* depende das concentrações de reagentes e produtos

Variação de energia livre, ΔG, e variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$, são expressões distintas. Cada reação química apresenta uma variação de energia livre padrão característica, que pode ser positiva, negativa, ou igual a zero, dependendo da constante de equilíbrio da reação. A variação de energia livre padrão indica o sentido de uma reação, bem como a distância em que ela se encontra do estado de equilíbrio *quando a concentração inicial de cada componente é 1,0M*, o pH 7,0, a temperatura 25°C e a pressão 101,3kPa (1 atm). Assim, $\Delta G'^{\circ}$ é uma constante, uma vez que o seu valor para uma determinada reação é característico e invariável. Entretanto, a variação de energia livre *real*, ΔG, depende das concentrações dos reagentes e produtos, além da temperatura, valores que não correspondem necessariamente aos das condições-padrão descritas anteriormente. Além disso, o valor de ΔG para qualquer reação que ocorre espontaneamente no sentido do equilíbrio é sempre negativo, torna-se menos negativo à medida que a reação evolui, atingindo o valor zero no ponto de equilíbrio, a partir do qual a reação não mais realiza trabalho.

Os valores de ΔG e $\Delta G'^{\circ}$ para uma determinada reação $A + B \rightleftharpoons C + D$, são relacionados pela equação

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (14\text{-}3)$$

na qual os termos em vermelho são aqueles *realmente prevalecentes* no sistema em observação. Os termos de concentração nesta equação expressam o efeito geralmente denominado ação das massas. Por exemplo, suponhamos que a reação $A + B \rightleftharpoons C + D$ está se processando sob condições-padrão de temperatura (25°C) e pressão (101,3kPa), mas que as concentrações de A, B, C e D *não* são iguais entre si e também não correspondem ao valor-padrão de 1,0M. Para determinar a variação real de energia livre, ΔG, sob essa condição não-padrão de concentração, à medida que a reação evolui da esquerda para a direita, basta introduzir as concentrações *reais* de A, B, C e D na Equação 14-3; os valores de R, T e $\Delta G'^{\circ}$ são conhecidos. O valor de ΔG é negativo e aproxima-se de zero à medida que a reação evolui, uma vez que as concentrações *reais* de A e B diminuem enquanto as concentrações de C e D aumentam. Pode-se observar que quando a reação está no estado de equilíbrio, ou seja, quando não existe qualquer força impulsionando a reação em qualquer um dos sentidos e ΔG é igual a zero, a Equação 14-3 reduz-se a:

$$0 = \Delta G'^{\circ} = RT \ \ln \frac{[\mathrm{C}]_{\mathrm{eq}}[\mathrm{D}]_{\mathrm{eq}}}{[\mathrm{A}]_{\mathrm{eq}}[\mathrm{B}]_{\mathrm{eq}}}$$

ou

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ \ln K'_{\mathrm{eq}}$$

a equação que, conforme mencionado anteriormente, relaciona variação de energia livre padrão e constante de equilíbrio.

O critério para avaliar a espontaneidade de uma reação é utilizar o valor de ΔG, não o de $\Delta G'^{\circ}$. Uma reação com valor de $\Delta G'^{\circ}$ positivo pode ocorrer no sentido direto *caso ΔG tenha valor negativo*. Isso é possível quando o termo RT ln ([produtos]/[reagentes]) na Equação 14-3 é negativo e apresenta um valor absoluto muito maior do que o de $\Delta G'^{\circ}$. Por exemplo, a remoção imediata dos produtos de uma reação pode manter a razão [produtos]/[reagentes] muito abaixo de 1, de tal forma que o termo RT ln ([produtos]/[reagentes]) apresente um valor bastante negativo.

$\Delta G'^{\circ}$ e ΔG são expressões da quantidade *máxima* de energia livre que uma determinada reação pode *teoricamente* liberar, ou seja, uma quantidade de energia utilizável apenas mediante a presença de um dispositivo perfeitamente eficiente em captá-la ou armazená-la. Já que tal dispositivo não é factível (alguma quantidade de energia livre é sempre perdida como entropia durante qualquer processo), a quantidade de trabalho realizado por uma reação para temperatura e pressão constantes é sempre menor do que a quantidade teoricamente disponível.

Uma outra questão importante é que algumas reações termodinamicamente favoráveis, isto é, reações para as quais os valores de $\Delta G'^{\circ}$ são altos e negativos não ocorrem em velocidades mensuráveis. Por exemplo, a combustão da lenha a CO_2 e H_2O é um processo altamente favorável termodinamicamente. Entretanto, a lenha mantém-se estável por anos, uma vez que a energia de ativação (veja Fig. 8-3) para a reação de combustão é maior do que a energia disponível à temperatura ambiente. Caso a energia de ativação necessária seja fornecida (por um fósforo aceso, por exemplo), a combustão terá início, convertendo a madeira nos produtos mais estáveis CO_2 e H_2O e liberando energia nas formas de calor e luz. O calor liberado por essa reação exotérmica fornece a energia de ativação necessária para combustão de regiões vizinhas à lenha, autoperpetuando esse processo.

Nas células vivas, as reações seriam extremamente lentas caso *não fossem catalisadas*. Entretanto, elas o são, não por suprimento de calor adicional, mas por diminuição da energia de ativação por meio da ação de enzimas. As enzimas fornecem uma via de reação alternativa com uma energia de ativação menor do que a da reação não-catalisada, de tal forma que, à temperatura ambiente, uma grande fração das moléculas de substrato adquire energia térmica suficiente para sobrepujar a barreira de ativação, aumentando drasticamente a velocidade de reação. *A variação de energia livre para uma reação é independente da via pela qual ela ocorre*; ela depende apenas da natureza e das concentrações dos reagentes iniciais e dos produtos finais. As enzimas, portanto, não alteram as constantes de equilíbrio; o que elas fazem é aumentar a *velocidade* pela qual a reação ocorre no sentido determinado pela termodinâmica.

As variações de energia livre padrão são aditivas

No caso de duas reações químicas em seqüência, $\mathrm{A} \rightleftharpoons \mathrm{B}$ e $\mathrm{B} \rightleftharpoons \mathrm{C}$, cada uma delas possui a sua própria constante de equilíbrio e a sua variação de energia livre padrão característica, $\Delta G_1'^{\circ}$ e $\Delta G_2'^{\circ}$. Como as duas reações são seqüenciais, o termo B é cancelado, resultando na reação total $\mathrm{A} \rightleftharpoons \mathrm{C}$, que possui a sua própria constante de equilíbrio e, portanto, a sua própria variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}_{\mathrm{total}}$. *Os valores de $\Delta G'^{\circ}$ para reações químicas seqüenciais são aditivos.* Para a reação total $\mathrm{A} \rightleftharpoons \mathrm{C}$, $\Delta G'^{\circ}_{\mathrm{total}}$ é a soma algébrica das variações de energia livre padrão individuais, $\Delta G_1'^{\circ}$ e $\Delta G_2'^{\circ}$, das duas reações separadas: $\Delta G'^{\circ}_{\mathrm{total}} = \Delta G_1'^{\circ}$ e $\Delta G_2'^{\circ}$. Esse princípio da bioenergética explica como uma reação termodinamicamente desfavorável (endergônica) em um determinado sentido pode ocorrer nesse mesmo sentido pelo acoplamento, por meio de um intermediário comum, com uma reação altamente exergônica.

$$\begin{array}{lll}
(1) & \mathrm{A} \longrightarrow \mathrm{B} & \Delta G_1'^{\circ} \\
(2) & \mathrm{B} \longrightarrow \mathrm{C} & \Delta G_2'^{\circ} \\
\hline
\textit{Somatório:} & \mathrm{A} \longrightarrow \mathrm{C} & \Delta G_1'^{\circ} + \Delta G_2'^{\circ}
\end{array}$$

Por exemplo, a síntese de glicose-6-fosfato é a primeira etapa na utilização da glicose por muitos organismos:

$$\text{Glicose} + \mathrm{P_i} \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \mathrm{H_2O} \qquad \Delta G'^{\circ} = 13{,}8\,\text{kJ/mol}$$

O valor positivo de $\Delta G'^{\circ}$ indica que sob condições-padrão a reação não tenderá a ocorrer espontaneamente no sentido em que está representada. Uma outra reação celular, a hidrólise do ATP a ADP e P_i, é altamente exergônica:

$$\mathrm{ATP} + \mathrm{H_2O} \longrightarrow \mathrm{ADP} + \mathrm{P_i} \qquad \Delta G'^{\circ} = -30{,}5\,\text{kJ/mol}$$

Estas duas reações compartilham os intermediários P_i e H_2O, podendo ser expressas como reações seqüenciais:

$$\begin{array}{ll}
(1) & \text{Glicose} + \mathrm{P_i} \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \mathrm{H_2O} \\
(2) & \mathrm{ATP} + \mathrm{H_2O} \longrightarrow \mathrm{ADP} + \mathrm{P_i} \\
\hline
\textit{Somatório:} & \mathrm{ATP} + \text{glicose} \longrightarrow \mathrm{ADP} + \text{glicose-6-fosfato}
\end{array}$$

A variação de energia livre padrão total é obtida pelo somatório dos valores de $\Delta G'^{\circ}$ para as reações individuais:

$$\Delta G'^{\circ} = 13{,}8\,\text{kJ/mol} + (-30{,}5\,\text{kJ/mol}) = -16{,}7\,\text{kJ/mol}$$

A reação total é exergônica. Neste caso, a energia armazenada nas ligações do ATP é utilizada para promover a síntese de glicose-6-fosfato, ainda que a sua formação a partir de glicose e fosfato seja endergônica. A *via de formação* de glicose-6-fosfato por transferência do fosfato do ATP é diferente das reações (1) e (2) apresentadas acima, embora o resultado final seja equivalente ao obtido pelo somatório das duas reações. Para efeito de cálculos termodinâmicos, o que importa é o estado do sistema no início e no final do processo, sendo irrelevante o caminho entre os estados inicial e final.

Como foi mencionado, $\Delta G'^{\circ}$ é uma forma de expressar a constante de equilíbrio de uma reação. Assim, para a reação (1) apresentada acima,

$$K'_{\mathrm{eq}_1} = \frac{[\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{glicose}][\mathrm{P_i}]} = 3{,}9 \times 10^{-3}\,\mathrm{M}^{-1}$$

Observe que a H_2O não está incluída nesta expressão. A constante de equilíbrio para a hidrólise do ATP é

$$K'_{\mathrm{eq}_2} = \frac{[\mathrm{ADP}][\mathrm{P_i}]}{[\mathrm{ATP}]} = 2 \times 10^{5}\,\mathrm{M}$$

Portanto, a constante de equilíbrio para as duas reações acopladas é:

$$\begin{aligned}
K'_{\mathrm{eq}_3} &= \frac{[\text{glicose-6-fosfato}][\mathrm{ADP}][\mathrm{P_i}]}{[\text{glicose}]\,[\mathrm{P_i}]\,[\mathrm{ATP}]} \\
&= (K'_{\mathrm{eq}_1})(K'_{\mathrm{eq}_2}) = (3{,}9 \times 10^{-3}\,\mathrm{M}^{-1})(2{,}0 \times 10^{5}\,\mathrm{M}) \\
&= 7{,}8 \times 10^{2}
\end{aligned}$$

Este cálculo ilustra uma importante questão com relação às constantes de equilíbrio: embora os valores de $\Delta G'^{\circ}$ para duas reações cujo somatório resulte em uma terceira sejam *aditivos*, a K'_{eq} para uma reação resultante do somatório de duas outras corresponde ao *produto* dos seus valores de K'_{eq} individuais, ou seja, as constantes de equilíbrio são *multiplicativas*. Assim, a K'_{eq} para formação de glicose-6-fosfato envolvendo acoplamento com a hidrólise do ATP é elevada por um fator de aproximadamente 2×10^5.

Essa estratégia envolvendo intermediários comuns é utilizada por todas as células vivas na síntese de intermediários metabólicos e componentes celulares, sendo requisito para o seu funcionamento a contínua disponibilidade de compostos como o ATP. Nos capítulos a seguir, serão consideradas algumas das mais importantes vias celulares de produção de ATP.

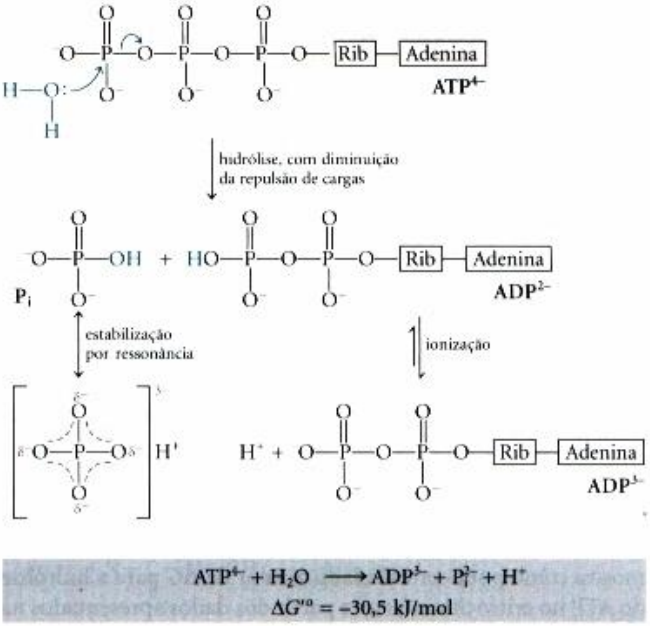
Transferência de Grupo Fosforil e ATP

Uma vez conhecidos alguns dos princípios fundamentais das transformações de energia nos sistemas químicos, pode-se agora analisar o ciclo de energia nas células, bem como a função especial do ATP na ligação entre processos catabólicos e anabólicos (veja Fig. 1-14). As células heterotróficas obtêm energia livre, de natureza química, por meio do catabolismo de moléculas nutrientes, utilizando-a para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i. O ATP, por sua vez, transfere parte de sua energia química para processos endergônicos, tais como síntese de intermediários metabólicos e macromoléculas a partir de precursores menores, transporte de substâncias contra gradientes de concentração por meio de membranas e movimento mecânico. Essa transferência de energia do ATP geralmente envolve a participação de ligação covalente do ATP na reação a ser processada, com a sua conseqüente conversão em ADP e P_i, ou, em algumas reações, em AMP e 2 P_i. Serão discutidas, a seguir, as bases químicas para as grandes variações de energia livre que acompanham a hidrólise do ATP e de outros compostos com grupos fosfato de alta energia. Além disso, será examinado o fato de que a maior parte dos casos de transferência de energia do ATP envolve a transferência de grupo, não simplesmente a sua hidrólise. A série de transformações de energia nas quais o ATP participa será ilustrada pela síntese de macromoléculas informacionais, pelo transporte de solutos através de membranas e pelo movimento produzido durante a contração muscular.

A variação de energia livre para a hidrólise do ATP é grande e negativa

A Figura 14-1 apresenta um resumo das bases químicas que justificam o valor negativo e relativamente alto da variação de energia livre padrão para a hidrólise do ATP. O rompimento hidrolítico do anidrido de ácido fosfórico terminal (fosfoanidrido) do ATP separa um dos três grupos fosfato carregados negativamente, aliviando parte da repulsão eletrostática na molécula; o P_i (HPO_4^{2-}) liberado pela hidrólise é estabilizado devido à formação de várias formas de ressonância, não possíveis na molécula de ATP; ADP^{2-}, o outro produto direto da hidrólise do ATP, ioniza-se imediatamente, liberando H^+ em um meio que apresenta $[H^+]$ muito baixa ($\sim 10^{-7}$M). Por serem as concentrações dos produtos diretos da hidrólise do ATP muito inferiores às concentrações no estado de equilíbrio, a ação das massas favorece a reação de hidrólise.

Embora a reação de hidrólise do ATP seja altamente exergônica ($\Delta G'^{\circ} = -30{,}5$kJ/mol), a molécula é cineticamente estável em pH 7,0, uma vez que a energia de ativação para a hidrólise do ATP é relativamente alta. Assim, o rompimento rápido das ligações fosfoanidrido dá-se apenas mediante catálise enzimática.


Rib
Adenina
ATP^{4-}
hidrólise, com diminuição da repulsão de cargas
P_i
ADP^{2-}
estabilização por ressonância
ionização
ADP^{3-}

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + P_i^{2-} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -30{,}5 \text{ kJ/mol}$$

Figura 14-1 – Bases químicas para a grande variação de energia livre associada à hidrólise do ATP. Primeiro, a hidrólise, por causar separação de carga, alivia a repulsão eletrostática entre as quatro cargas negativas do ATP. Segundo, o fosfato inorgânico (P_i) liberado pela hidrólise é estabilizado pela formação de um híbrido de ressonância, no qual cada uma das quatro ligações P—O apresenta o mesmo grau de caráter de dupla ligação e os íons hidrogênio não se encontram permanentemente associados a qualquer um dos átomos de oxigênio. Certo grau de estabilização por ressonância também ocorre nos fosfatos envolvidos nas ligações éster ou anidrido, mas em menor quantidade do que no P_i. Terceiro, ADP^{2-} produzido pela hidrólise ioniza-se imediatamente, liberando um próton em um meio de $[H^+]$ muito baixa (pH 7,0). Um quarto fator (não apresentado nesta figura) que favorece a hidrólise do ATP é o maior grau de solvatação (hidratação) dos produtos P_i e ADP em relação ao ATP, o que proporciona uma estabilização adicional dos produtos em relação aos reagentes.

A variação de energia livre padrão para a hidrólise do ATP é −30,5kJ/mol sob condições-padrão, embora a energia livre *real* de hidrólise (ΔG) do ATP no interior das células vivas seja muito diferente. Isso porque as concentrações celulares de ATP, ADP e P_i não são idênticas entre si, além de serem muito inferiores às concentrações-padrão de 1,0M (Tabela 14-5). Além disso, no citosol, o Mg^{2+} liga-se ao ATP e ADP (Fig. 14-2), sendo que para a maioria das reações enzimáticas que envolvem o ATP como doador de um grupo fosforil o verdadeiro substrato é o comple-

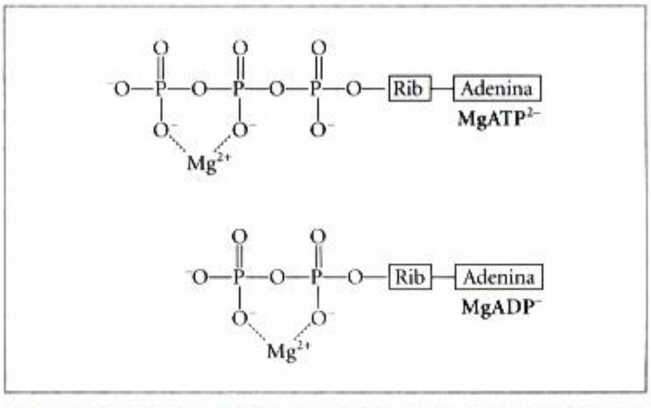


Figura 14-2 – Mg^{2+} e ATP. A formação de complexos de Mg^{2+} isola parcialmente as cargas negativas, influenciando a conformação dos grupos fosfato em nucleotídeos tais como ATP e ADP.

Tabela 14-5 – Concentrações de nucleotídeos de adenina, fosfato inorgânico e fosfocreatina encontradas em diferentes células*

	Concentração (mM)				
	ATP	ADP†	AMP	P_i	PCr
Hepatócito de rato	3,38	1,32	0,29	4,8	0
Miócito de rato	8,05	0,93	0,04	8,05	28
Neurônio de rato	2,59	0,73	0,06	2,72	4,7
Eritrócito humano	2,25	0,25	0,02	1,65	0
Célula da *E. coli*	7,90	1,04	0,82	7,9	0

*Para os eritrócitos, as concentrações correspondem às encontradas no citosol (os eritrócitos humanos não possuem núcleo ou mitocôndrias). Para os demais tipos de células, os dados são referentes a todo o conteúdo celular, embora o citosol e as mitocôndrias apresentem concentrações de ADP muito diferentes. A fosfocreatina (PCr) é discutida na página 391.

†Estes valores refletem a concentração total; os valores verdadeiros para ADP livre podem ser muito menores (veja Adendo 14-2).

xo $MgATP^{2-}$ e o verdadeiro valor de $\Delta G'^{\circ}$, portanto, é o valor correspondente ao da hidrólise do complexo. O Adendo 14-2 mostra como pode ser calculado o valor de ΔG para a hidrólise do ATP no eritrócito intacto, a partir dos dados apresentados na Tabela 14-5. ΔG para a hidrólise do ATP nas células intactas, geralmente denominado ΔG_p, é muito mais negativo do que $\Delta G'^{\circ}$, variando de –50 a –65kJ/mol; ΔG_p é freqüentemente denominado **do potencial de fosforilação**. Entretanto, nas discussões a seguir será utilizada a variação de energia livre padrão para a hidrólise do ATP, uma vez que esse parâmetro permite comparações, nas mesmas bases, com a energética de outras reações celulares. Deve-se considerar, entretanto, que nas células vivas, tanto para a hidrólise do ATP quanto para as demais reações, o valor pertinente é o de ΔG, o qual pode ser substancialmente diferente do valor de $\Delta G'^{\circ}$.

Outros compostos fosforilados e tioésteres também apresentam altos valores de energia livre de hidrólise

O fosfoenolpiruvato (Fig. 14-3) contém uma ligação éster fosfato capaz de sofrer hidrólise produzindo a forma enólica do piruvato, que sofre imediata tautomerização para a forma cetônica, mais estável. Como o reagente (fosfoenolpiruvato) apresenta uma única forma (enol) e o produto (piruvato) apresenta duas formas possíveis, o produto é mais estável do que o reagente. Esse é o fator que mais contribui para a alta energia livre padrão de hidrólise do fosfoenolpiruvato: $\Delta G'^{\circ} = -61{,}9\text{kJ/mol}$.

Um outro composto com três carbonos, o 1,3-difosfoglicerato (Fig. 14-4), possui uma ligação anidrido entre o grupo carboxila no C-1 e o ácido fosfórico. A hidrólise desse acilfosfato é acompanhada por uma variação de energia livre padrão alta e

Adendo 14-2

A energia livre de hidrólise do ATP no interior das células: O verdadeiro custo dos negócios metabólicos

A energia livre padrão de hidrólise do ATP é –30,5kJ/mol. Entretanto, as concentrações celulares de ATP, ADP e P_i não somente são diferentes entre si, mas também muito inferiores às concentrações-padrão 1M (veja Tabela 14-5). Além disso, o pH celular pode ser ligeiramente diferente do pH padrão 7,0. Assim, a energia livre *real* de hidrólise do ATP nas condições intracelulares, ΔG_p, difere da variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$. O valor de ΔG_p pode ser facilmente calculado. Por exemplo, nos eritrócitos humanos, as concentrações de ATP, ADP e P_i são 2,25, 0,25 e 1,65mM, respectivamente. Para simplificar, pode-se assumir que o pH é 7,0 e a temperatura é 25°C (valores-padrão). O valor real para a energia livre de hidrólise do ATP no eritrócito, sob essas condições, é dado pela seguinte relação

$$\Delta G_p = \Delta G'^{\circ} + RT \ \ln \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

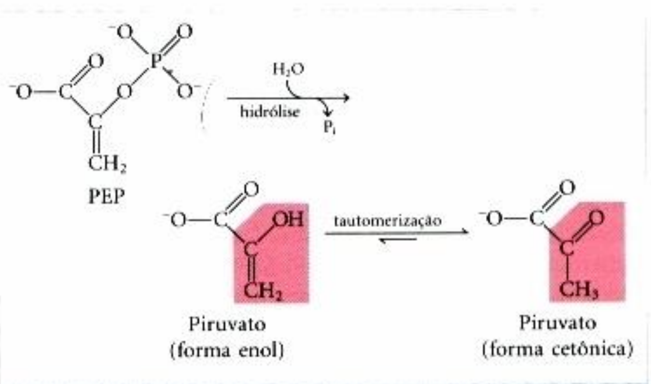
Substituindo os valores apropriados, obtém-se:

$$\begin{aligned}
\Delta G_p &= -30.500\text{J/mol} + (8{,}315\text{J/mol} \cdot \text{K})(298\text{K}) \\
&\qquad \times \ln \frac{(2{,}50 \times 10^{-4})(1{,}65 \times 10^{-3})}{2{,}25 \times 10^{-3}} \\
&= -30.500\text{J/mol} + (2.480\text{J/mol}) \ln (1{,}83 \times 10^{-4}) \\
&= -30.500\text{J/mol} - 21.300\text{J/mol} \\
&= -51.800\text{J/mol} \\
&= -51{,}8\text{kJ/mol}
\end{aligned}$$

Assim, ΔG_p, a variação de energia livre real para a hidrólise do ATP no eritrócito intacto (–51,8kJ/mol) é muito superior à variação de energia livre padrão (–30,5kJ/mol). Da mesma forma, a energia livre necessária para *sintetizar* ATP a partir de ADP e P_i, sob as condições que prevalecem no eritrócito, seria 51,8kJ/mol.

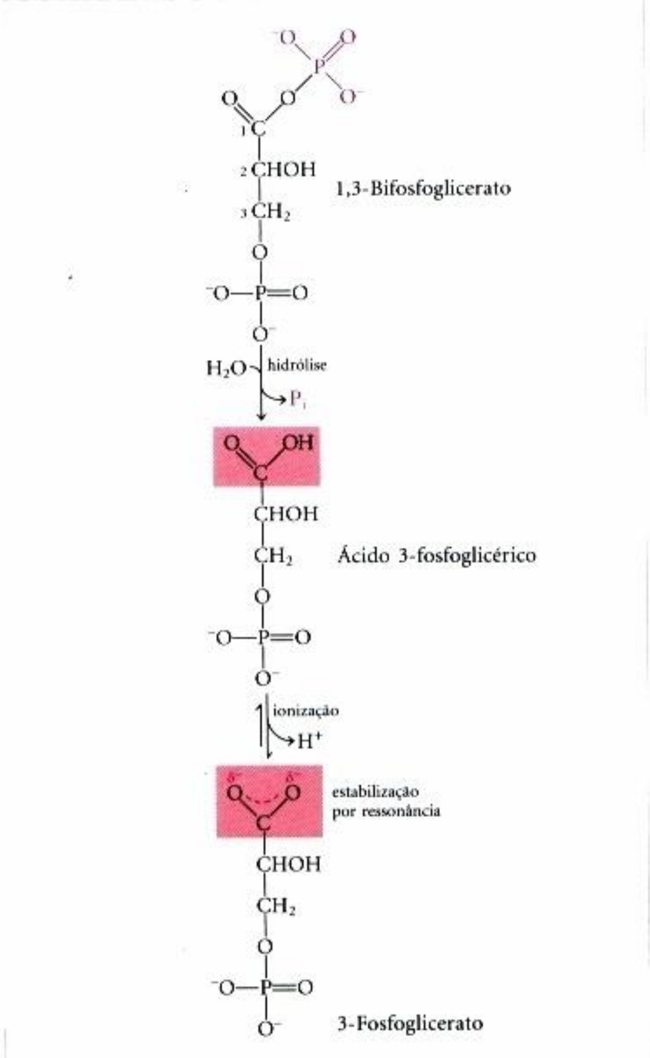
Como as concentrações de ATP, ADP e P_i diferem de um tipo de célula para outro (veja Tabela 14-5), os valores de ΔG_p para a hidrólise do ATP nas diferentes células também são diferentes. Além disso, em uma célula específica, o valor de ΔG_p pode variar com o tempo, dependendo das condições metabólicas da célula e de como elas interferem nas concentrações de ATP, ADP e P_i, além de H^+ (pH). Pode-se calcular a variação real de energia livre padrão para uma determinada reação metabólica nas condições em que ela ocorre na célula, desde que sejam conhecidas as concentrações de todos os reagentes e produtos da reação, além de outros fatores, tais como pH, temperatura e concentração de Mg^{2+}, que podem afetar $\Delta G'^{\circ}$ e, portanto, a variação de energia livre calculada, ΔG_p.

Uma complicação adicional é que as concentrações totais de ATP, ADP, P_i e H^+ podem ser substancialmente maiores do que as concentrações livres, as quais constituem os valores termodinamicamente relevantes. A diferença deve-se às fortes ligações de ATP, ADP e P_i a proteínas celulares. Por exemplo, a concentração de ADP livre no músculo em repouso varia de 1 a 37μM. Usando-se o valor 25μM no cálculo descrito anteriormente, obtém-se ΔG_p igual a –57,5kJ/mol. O valor exato de ΔG_p é, certamente, menos instrutivo do que a generalização que pode ser feita sobre a variação de energia livre real: *in vivo*, a energia liberada pela hidrólise do ATP é maior do que a variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$.



$PEP^{3-} + H_2O \longrightarrow piruvato^{-} + P_i^{2-} \quad \Delta G'^{\circ} = -61{,}9kJ/mol$

Figura 14-3 – Hidrólise do fosfoenolpiruvato (PEP). Catalisada pela piruvato quinase, esta reação é seguida por tautomerização espontânea do produto, o piruvato. A tautomerização não é possível no PEP e, assim, os produtos das hidrólises são mais estáveis do que os reagentes. Também ocorre estabilização do Pᵢ por ressonância, conforme mostrado na Figura 14-1.

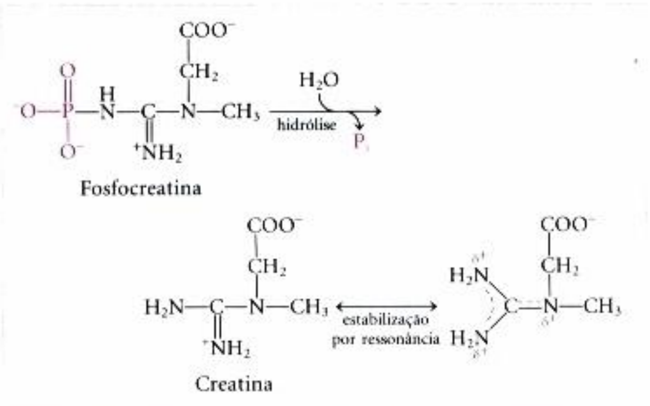


$1{,}3\text{-}Bifosfoglicerato^{4-} + H_2O \longrightarrow 3\text{-}fosfoglicerato^{3-} + P_i^{2-} + H^{+}$
$\Delta G'^{\circ} = -49{,}3kJ/mol$

Figura 14-4 – Hidrólise do 1,3-difosfoglicerato. O produto direto da hidrólise é o ácido 3-fosfoglicérico, que apresenta um grupo ácido carboxílico não-dissociado, mas a dissociação ocorre imediatamente. A ionização e as estruturas de ressonância tornam o produto mais estável do que os reagentes. A estabilização do Pᵢ por ressonância representa uma contribuição adicional para a variação de energia livre negativa.

negativa ($\Delta G'^{\circ} = -49{,}3kJ/mol$), que pode, também, ser justificada em termos da estrutura dos reagentes e produtos. Quando H_2O é adicionada à ligação anidrido do 1,3-difosfoglicerato, um dos produtos diretos, o ácido 3-fosfoglicérico, pode perder imediatamente um próton formando um íon carboxilato, o 3-fosfoglicerato, que apresenta duas formas de ressonância com a mesma probabilidade de ocorrência (Fig. 14-4). A remoção do produto direto, o ácido 3-fosfoglicérico, e a formação do íon estabilizado por ressonância favorecem a reação direta.

Na fosfocreatina (Fig. 14-5), a ligação P—N pode ser hidrolisada liberando creatina livre e P_i. A liberação do P_i e a estabilização por ressonância da creatina favorecem a reação direta. A variação de energia livre padrão de hidrólise da creatina é também alta, ou seja, aproximadamente −43kJ/mol.



$Fosfocreatina^{2-} + H_2O \longrightarrow creatina + P_i^{2-} \quad \Delta G'^{\circ} = -43{,}0kJ/mol$

Figura 14-5 – Hidrólise da fosfocreatina. O rompimento da ligação P—N da fosfocreatina produz a creatina, que é estabilizada pela formação de um híbrido de ressonância. O outro produto, o Pᵢ, também sofre estabilização por ressonância.

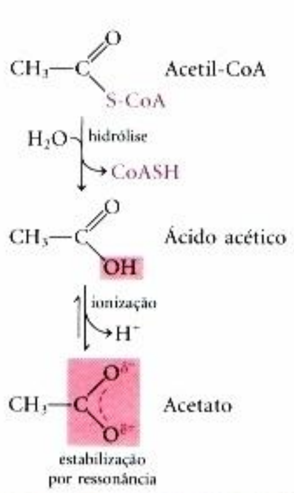
Em todas as reações em que ocorre liberação de fosfato, as diversas formas de ressonância possíveis para P_i (Fig. 14-1) o estabilizam em relação aos reagentes, contribuindo ainda mais para uma variação de energia livre negativa. A Tabela 14-6 mostra a energia livre padrão de hidrólise para alguns compostos fosforilados.

Tabela 14-6 – Valores da energia livre padrão de hidrólise de alguns compostos fosforilados e da acetil-coenzima A (um tioéster)

	$\Delta G'^{\circ}$	
	(kJ/mol)	**(kcal/mol)**
Fosfoenolpiruvato	−61,9	−14,8
1,3-difosfoglicerato (→ 3-fosfoglicerato + Pᵢ)	−49,3	−11,8
Fosfocreatina	−43,0	−10,3
ADP (→ AMP + Pᵢ)	−32,8	−7,8
ATP (→ ADP + Pᵢ)	−30,5	−7,3
ATP (→ AMP + PPᵢ)	−45,6	−10,9
AMP (→ adenosina + Pᵢ)	−14,2	−3,4
PPᵢ (→ 2Pᵢ)	−19,0	−4,0
Glicose-1-fosfato	−20,9	−5,0
Frutose-6-fosfato	−15,9	−3,8
Glicose-6-fosfato	−13,8	−3,3
Glicerol-1-fosfato	−9,2	−2,2
Acetil-CoA	−31,4	−7,5

Fonte: Dados extraídos em sua maior parte de Jencks WP. (1976) In *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (Fasman GD, ed), *Physical and Chemical Data*, Vol. I, pp. 296-304, CRC Press, Boca Raton, FL. O novo valor para a energia livre da hidrólise do PPᵢ veio de Frey, P.A. & Arabshahi, A. (1995). Standard free-energy change for the hidrolysis of the α-β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* **34**, 11.307-11.310.

Os **tioésteres**, nos quais o oxigênio na ligação éster é substituído por um átomo de enxofre, também apresentam energia livre padrão de hidrólise alta e negativa. A acetil-coenzima A, ou acetil-CoA (Fig. 14-6), é um dos muitos tioésteres importantes no metabolismo. O grupo acila nesses compostos é ativado por transacilação, por condensação ou por reações de oxidação-redução. Os tioésteres sofrem muito menos estabilização por ressonância do que os ésteres de oxigênio (Fig. 14-7); conseqüentemente, a diferença de energia livre entre os reagentes e os seus produtos de hidrólise, que *são* estabilizados por ressonância, é maior para os tioésteres quando comparados aos ésteres de oxigênio equivalentes. Em ambos os casos, a hidrólise do éster produz um ácido carboxílico, que pode ionizar-se assumindo diferentes formas de ressonância (Fig. 14-6). Em conjunto, esses fatores resultam em um $\Delta G'^{\circ}$ bastante negativo para a hidrólise do acetil-CoA, ou seja, −31kJ/mol.



Acetil-CoA + $H_2O \longrightarrow$ acetato$^-$ + CoA + H^+ $\Delta G'^{\circ} = -32{,}2$kJ/mol

Figura 14-6 – Hidrólise da acetil-coenzima A. A acetil-CoA é um tioéster com energia livre de hidrólise alta e negativa. Os tioésteres contêm um átomo de enxofre na posição em que os ésteres de oxigênio possuem um átomo de oxigênio. A estrutura completa da coenzima A (CoASH) é mostrada na Figura 10-41.

Em resumo, para reações de hidrólise com variações de energia livre padrão altas e negativas, os produtos são mais estáveis do que os reagentes, em decorrência de um ou mais dos seguintes fatores: (1) a tensão da ligação nos reagentes devido à repulsão eletrostática é aliviada pela separação das cargas, como no caso do ATP (descrito anteriormente); (2) os produtos são estabilizados por ionização, como no caso do ATP, acilfosfatos e tioésteres; (3) os produtos são estabilizados por isomerização (tautomerização), como no caso do fosfoenolpiruvato; e/ou (4) os produtos são estabilizados por ressonância, como no caso da creatina liberada da fosfocreatina, do íon carboxilato liberado dos acilfosfatos e tioésteres, e do fosfato (P_i) liberado das ligações anidrido ou éster.

O ATP fornece energia por transferência de grupos, e não por simples hidrólise

Ao longo deste livro serão encontradas reações ou processos para os quais o ATP fornece energia, sendo que a sua participação é geralmente indicada conforme apresentado na Figura 14-8a, ou seja, com uma seta simples mostrando a conversão do ATP em ADP e P_i, ou do ATP em AMP e PP_i (pirofosfato). Essas reações do ATP, quando apresentadas dessa forma, aparentam ser simples reações de hidrólise nas quais a água desloca o P_i ou o PP_i, e, assim, poder-se-ia supor que uma reação dependente de ATP é "impulsionada pela hidrólise do ATP". Entretanto, esse *não* é o caso. A hidrólise do ATP, por si, geralmente nada produz além da liberação de calor, o qual não é capaz de promover um processo químico em um sistema isotérmico. As reações representadas por setas simples, tais como as apresentadas na Figura 14-8a, quase sempre correspondem a processos compreendidos por duas etapas (Fig. 14-8b), nas quais parte da molécula de ATP, ou seja, os grupos fosforil, pirofosforil ou adenilato (AMP) são primeiramente transferidos para uma molécula de substrato ou para um resíduo de aminoácido em uma enzima, ligando-se covalentemente a eles e aumentando os seus conteúdos de energia livre. Na segunda etapa, o segmento contendo o grupo fosforil transferido na primeira etapa é deslocado, liberando P_i, PP_i ou AMP. Assim, o ATP participa *covalentemente* da reação catalisada enzimaticamente, para a qual ele fornece energia livre.

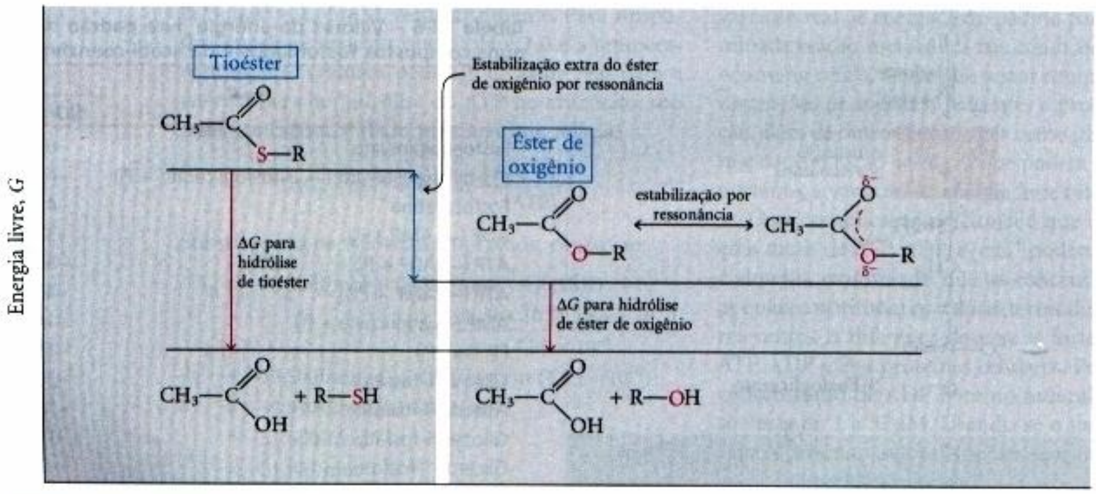
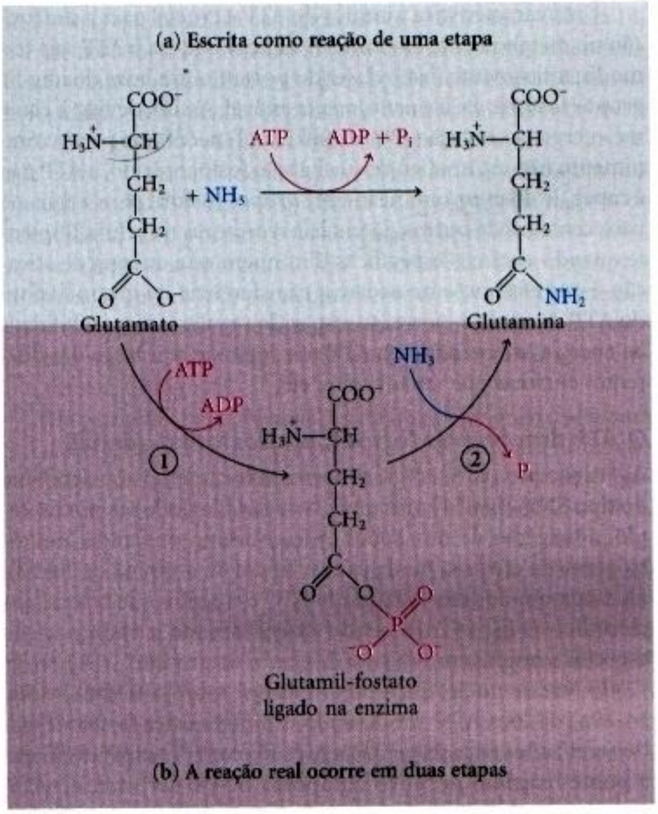

Energia livre, G
Tioéster
CH_3-C
O
S—R
Estabilização extra do éster de oxigênio por ressonância
Éster de oxigênio
O—R
estabilização por ressonância
δ−
ΔG para hidrólise de tioéster
ΔG para hidrólise de éster de oxigênio
OH
+ R—SH
+ R—OH

Figura 14-7 – Energia livre de hidrólise dos tioésteres e ésteres de oxigênio. Os *produtos* de ambos os tipos de reação de hidrólise possuem aproximadamente a mesma quantidade de energia livre (G), mas os tioésteres contêm maior quantidade de energia livre do que os ésteres de oxigênio. A sobreposição de orbitais entre os átomos de O e C resulta em estabilização por ressonância nos ésteres de oxigênio, mas a sobreposição de orbitais entre os átomos de S e C é pouco expressiva, resultando em baixo grau de estabilização por ressonância.


(a) Escrita como reação de uma etapa

(b) A reação real ocorre em duas etapas

Figura 14-8 – Hidrólise do ATP em duas etapas. A contribuição do ATP para uma reação é geralmente mostrada como apresentando uma única etapa (**a**); entretanto, é quase sempre um processo de duas etapas, como apresentado para a reação catalisada pela glutamina sintetase dependente de ATP (**b**). ① Um grupo fosforil é primeiramente transferido do ATP para o glutamato, ② sofrendo deslocamento por NH_3 e sendo liberado na forma de P_i.

Entretanto, alguns processos envolvem a hidrólise direta do ATP (ou GTP). Por exemplo, a ligação não-covalente do ATP (ou do GTP), seguida por sua hidrólise a ADP (ou GDP) e P_i, pode fornecer a energia necessária para alternar a conformação de algumas proteínas, produzindo trabalho mecânico. Isso ocorre na contração muscular e no movimento de enzimas ao longo da cadeia de DNA ou no movimento dos ribossomos ao longo do RNA mensageiro. As reações dependentes de energia catalisadas pelas helicases, proteína RecA, e algumas topoisomerases (Capítulo 25) também envolvem a hidrólise direta de ligações fosfoanidrido. Proteínas ligantes de GTP que atuam em vias de sinalização hidrolisam o GTP diretamente, promovendo alterações conformacionais em resposta a sinais desencadeados por hormônios ou por outros fatores extracelulares (Capítulo 13).

Os compostos de fosfato encontrados nos organismos vivos podem ser divididos arbitrariamente em dois grupos, com base em seus valores de energia livre padrão de hidrólise (Fig. 14-9). Os compostos de "alta energia" apresentam valor de $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólise mais negativo do que –25kJ/mol, enquanto os compostos de "baixa energia" apresentam valor de $\Delta G'^{\circ}$ menos negativo. Com base nesse critério, o ATP, com $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólise igual a –30,5kJ/mol (–7,3kcal/mol), é um composto de alta energia, enquanto a glicose-6-fosfato, com $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólise igual a –13,8kJ/mol (–3,3kcal/mol), é um composto de baixa energia.

O termo "ligação fosfato de alta energia", amplamente utilizado por bioquímicos para descrever o rompimento da ligação P—O na reação de hidrólise, é incorreto por sugerir que a energia é intrínseca à ligação. De fato, o rompimento de ligações químicas requer um *fornecimento* de energia. Entretanto, a energia livre liberada pela hidrólise de compostos de fosfato não provém da ligação específica que é rompida, mas, antes, ela resulta dos produtos da reação, que apresentam um conteúdo de energia livre menor do que o dos reagentes. Por simplificação, algumas

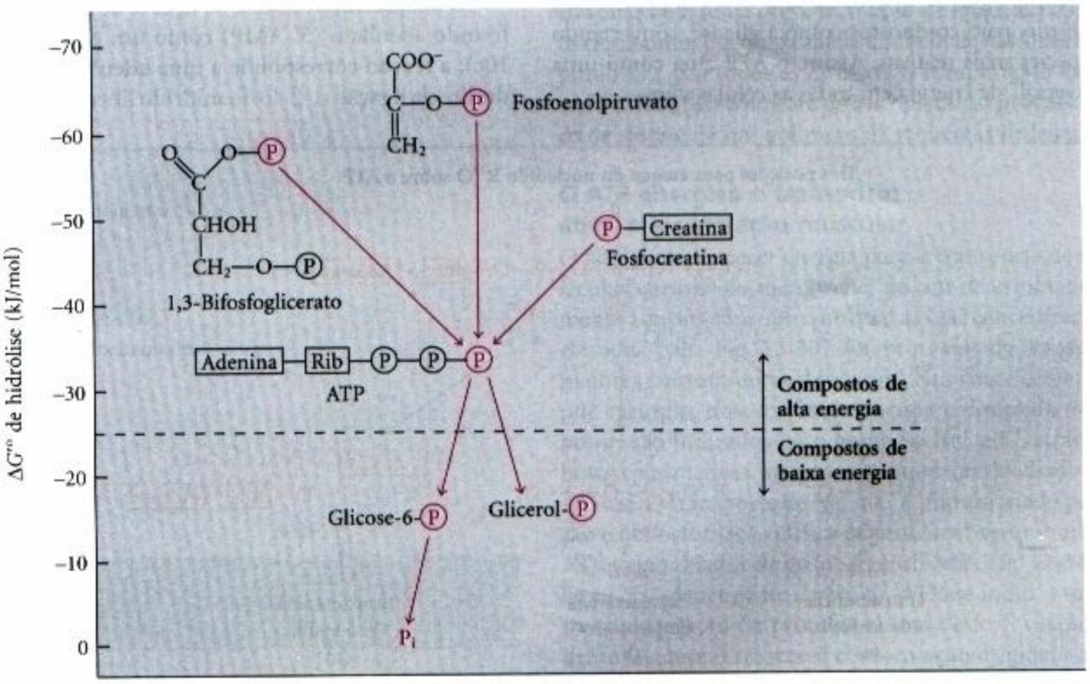


Figura 14-9 – Seleção dos compostos fosfatados de importância biológica por energia livre padrão de hidrólise. Esta figura apresenta o fluxo dos grupos fosforil, representado por Ⓟ, a partir de doadores de grupos fosforil de alta energia, via ATP, para moléculas receptoras (tal como a glicose e o glicerol), formando seus derivados fosfato de baixa energia. Esse fluxo de grupos fosforil, catalisado por enzimas denominadas **quinases**, ocorre nas condições intracelulares com uma perda total de energia livre. A hidrólise de compostos de fosfato de baixa energia libera P_i, que apresenta um potencial de transferência de grupo fosforil ainda menor (conforme definido no texto).

vezes será utilizado o termo "compostos de fosfato de alta energia" quando nos referirmos ao ATP ou a outros compostos de fosfato com energia livre padrão de hidrólise bastante negativa.

Por serem aditivas as variações de energia livre de reações seqüenciais, qualquer composto fosforilado pode ser sintetizado mediante acoplamento com o rompimento de um outro composto fosforilado com energia livre de hidrólise mais negativa. Por exemplo, pelo fato de o rompimento do P_i do fosfoenolpiruvato (PEP) liberar mais energia do que a energia necessária para a condensação do P_i com ADP, a transferência direta de um grupo fosforil do PEP para o ADP é termodinamicamente viável:

		$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)
(1)	$PEP + H_2O \longrightarrow$ piruvato $+ P_i$	−61,9
(2)	$ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O$	+30,5
Somatório:	$PEP + ADP \longrightarrow$ piruvato $+ ATP$	−31,4

Podem-se, portanto, descrever os compostos fosforilados como sendo dotados de um alto ou baixo potencial de transferência de grupos fosforil. Assim, o potencial de transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato é muito alto, o do ATP é alto e o da glicose-6-fosfato é baixo.

Grande parte do catabolismo é direcionada para a síntese de compostos de fosfato de alta energia, embora a formação deles não seja um objetivo em si. Antes, essa é a forma de ativar uma grande variedade de compostos para sofrer transformações químicas posteriores. A transferência de um grupo fosforil para um composto efetivamente injeta energia livre nele, de tal forma que ele passa a apresentar maior quantidade de energia livre para liberar em transformações metabólicas subseqüentes. Foi mostrado acima como a síntese da glicose-6-fosfato é associada à transferência do grupo fosforil do ATP. No próximo capítulo será examinado como a fosforilação ativa ou "prepara" a glicose para as reações catabólicas que ocorrem em quase todas as células vivas. Devido a sua posição intermediária na escala de potencial de transferência de grupo, o ATP é capaz de transportar energia dos compostos de fosfato de alta energia, produzidos pelo catabolismo, para compostos como a glicose, convertendo esses em espécies mais reativas. Assim, o ATP atua como uma "moeda universal" de energia em todas as células vivas.

Uma característica química do ATP é crucial para a sua função no metabolismo: embora em solução aquosa o ATP seja termodinamicamente instável, sendo portanto um bom doador de grupos fosforil, ele é *cineticamente* estável. Assim, devido à enorme energia de ativação (200 a 400kJ/mol) necessária para o rompimento não enzimático de sua ligação fosfoanidrido, o ATP não é capaz de doar espontaneamente grupos fosforil para a água ou para centenas de outros potenciais receptores na célula. Somente quando enzimas específicas diminuem essa energia de ativação é que efetivamente ocorre a transferência do grupo fosforil do ATP. A célula é, portanto, capaz de regular a disponibilidade da energia armazenada no ATP por meio de regulação das diferentes enzimas que atuam sobre ele.

O ATP doa grupos fosforil, pirofosforil e adenilil

As reações do ATP são geralmente deslocamentos nucleofílicos do tipo SN2 (pág. 51), nos quais o nucleófilo pode ser, por exemplo, o oxigênio de um álcool ou carboxilato ou, ainda, um nitrogênio da creatina ou da cadeia lateral da arginina ou histidina. Cada um dos três fosfatos do ATP é suscetível ao ataque nucleofílico (Fig. 14-10), sendo que o ataque a cada posição específica resulta em um tipo diferente de produto.

O ataque nucleofílico de um álcool sobre o fosfato γ (Fig. 14-10a) desloca ADP produzindo um novo éster fosfato. Estudos realizados com reagentes marcados com ^{18}O mostraram que a ponte oxigênio no novo composto não é derivada do ATP, mas sim do álcool; o grupo transferido do ATP não é um fosfato ($—OPO_3^{2-}$), mas sim um fosforil ($—PO_3^{2-}$). A transferência do grupo fosforil do ATP para o glutamato (Fig. 14-8) ou para a glicose (pág. 212) envolve ataque na posição γ da molécula de ATP.

O ataque ao fosfato β do ATP desloca AMP, cedendo um grupo pirofosforil (não-pirofosfato) para o ataque nucleofílico (Fig. 14-10b). Por exemplo, a formação do 5′-fosforibose 1-pirofosfato, um intermediário central na síntese do nucleotídeo, ocorre à medida que um grupo —OH da ribose ataca o fosfato β.

O ataque nucleofílico à posição α do ATP desloca PP_i, transferindo adenilato (5′-AMP) como um grupo adenilil (Fig. 14-10c); a reação corresponde a uma **adenililação.** Note que a hidrólise da ligação α-β-fosfoanidrido libera mais energia (~46kJ/

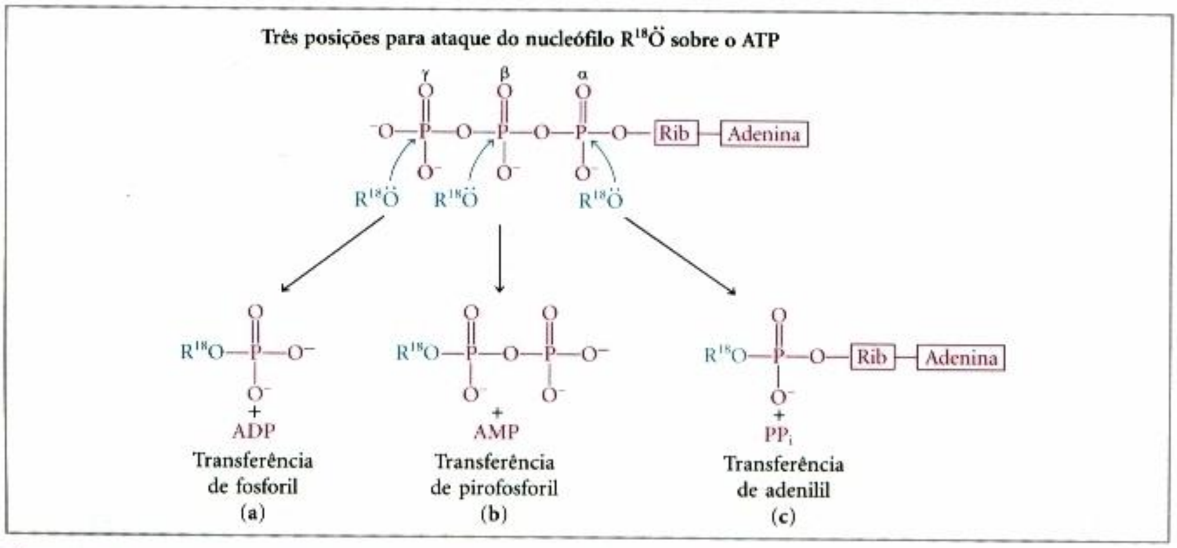
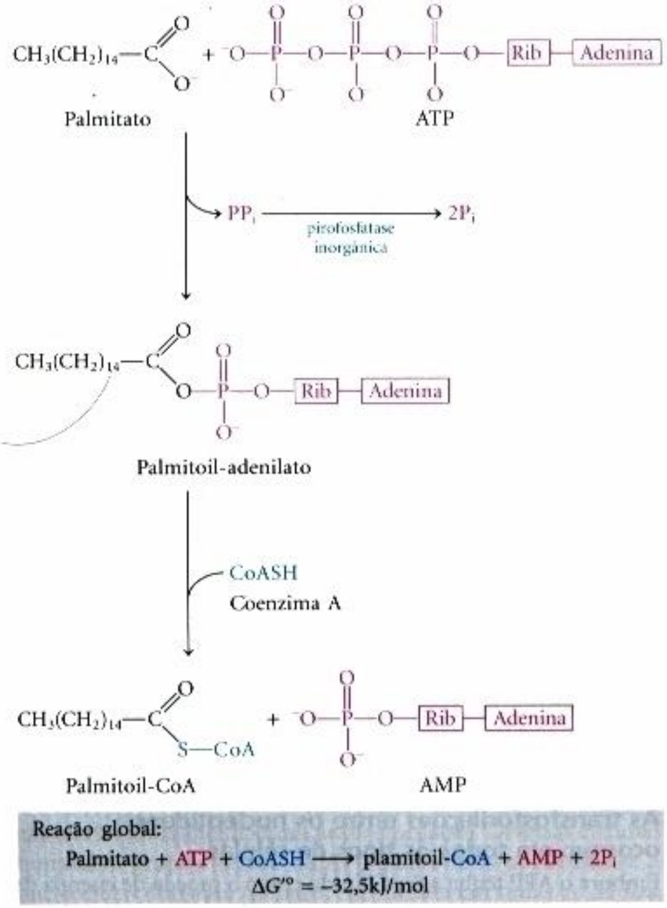

Três posições para ataque do nucleófilo R¹⁸Ö sobre o ATP
γ
β
α
Rib
Adenina
R¹⁸Ö
R¹⁸Ö
R¹⁸Ö
R¹⁸O
ADP
AMP
PPᵢ
Rib
Adenina
Transferência de fosforil
(a)
Transferência de pirofosforil
(b)
Transferência de adenilil
(c)

Figura 14-10 – Reações de deslocamento nucleofílico do ATP. Um dos três átomos de P (α, β ou γ) pode servir como alvo eletrofílico para o ataque nucleofílico, neste caso pelo nucleófilo marcado $R—^{18}O$:. O nucleófilo pode ser um álcool (ROH), um grupo carboxila ($RCOO^-$) ou ainda um fosfoanidrido (um nucleosídeo mono ou difosfato, por exemplo). (**a**) Quando o oxigênio do nucleófilo ataca a posição γ, a ponte oxigênio do produto sofre marcação, indicando que o grupo transferido do ATP não é um fosfato ($—OPO_3^{2-}$), mas sim um fosforil ($—PO_3^{2-}$). (**b**) O ataque na posição β desloca AMP promovendo a transferência de um grupo pirofosforil (não-pirofosfato) para o nucleófilo. (**c**) O ataque na posição α desloca PP_i transferindo o grupo adenilil para o nucleófilo.

mol) do que a hidrólise da ligação β-γ (~31kJ/mol) (Tabela 14-6). Além disso, o PP_i formado como um subproduto da adenililação é hidrolisado liberando dois P_i por ação da **pirofosfatase inorgânica**, uma enzima de presença constante, liberando 19kJ/mol e fornecendo, portanto, uma energia adicional de "arranque" para a reação de adenililação. Assim, ambas as ligações fosfoanidrido do ATP são rompidas na reação total. As reações de adenililação são, portanto, termodinamicamente muito favoráveis. Quando a energia do ATP é requerida para promover uma reação metabólica particularmente desfavorável, a adenililação é freqüentemente o mecanismo de acoplamento de energia empregado. A ativação dos ácidos graxos é um bom exemplo dessa estratégia.

Na primeira etapa de ativação de um ácido graxo, seja para oxidação geradora de energia (veja Fig. 17-5) ou para utilização na síntese de lipídios mais complexos (Capítulo 21), ele é ligado ao carreador coenzima A (Fig. 14-11). A condensação direta de um ácido graxo com a coenzima A é endergônica, mas a formação do acil graxo-CoA torna-se exergônica pela remoção seqüencial de *dois* grupos fosforil do ATP. Primeiramente, o adenilato (AMP) é transferido do ATP para o grupo carboxila do ácido graxo, formando um anidrido misto (acil graxo-adenilato) e liberando PP_i. O grupo tiol da coenzima A desloca então o grupo adenilato, formando um tioéster com o ácido graxo. O somatório dessas duas reações é energeticamente equivalente à hidrólise exergônica do ATP em AMP e PP_i ($\Delta G'^{\circ} = -45,6$kJ/mol) e à formação endergônica do acil graxo-CoA ($\Delta G'^{\circ} = 31,4$kJ/mol). A formação do acil graxo-CoA torna-se energeticamente favorável pela hidrólise do PP_i por meio da ação da pirofosfatase inorgânica. Assim, na ativação de um ácido graxo, ambas as ligações fosfoanidrido do ATP são rompidas. O valor de $\Delta G'^{\circ}$ resultante corresponde ao somatório dos valores de $\Delta G'^{\circ}$ para o rompimento dessas ligações, ou seja, −45,6kJ/mol + (−19,22)kJ/mol:

$$\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{AMP} + 2\text{P}_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -64{,}8\text{kJ/mol}$$



Reação global:
Palmitato + ATP + CoASH ⟶ plamitoil-CoA + AMP + $2P_i$
$\Delta G'^{\circ} = -32{,}5$kJ/mol

Figura 14-11 – Reação de adenililação na ativação de um ácido graxo. Ambas as ligações fosfoanidrido do ATP são eventualmente rompidas na formação de palmitoil-coenzima A. Primeiro, o ATP doa adenilato (AMP), formando o acil graxo-adenilato e liberando PP_i, que é hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica. O grupo acil-graxo "energizado" é então transferido para a coenzima A (CoASH), com a qual ele forma uma ligação tioéster que conserva parte da energia resultante do ATP.

A ativação dos aminoácidos que precede a formação de proteínas (veja Fig. 27-16) é acompanhada de uma série de reações análogas nas quais a coenzima A é substituída por uma molécula de RNA de transferência. Uma rara utilização do rompimento do ATP em AMP e PP_i ocorre no vaga-lume, que utiliza ATP como fonte de energia para produção de lampejos de luz (Adendo 14-3).

A síntese de macromoléculas informacionais requer energia

Quando precursores simples são ligados formando polímeros de alto peso molecular com seqüências ordenadas (DNA, RNA, proteínas), conforme descrito em detalhes na Parte IV deste livro, é necessária energia tanto para a condensação das unidades monoméricas quanto para a formação das seqüências *ordenadas*. Os precursores das sínteses de DNA e RNA são nucleosídeos trifosfato, sendo a polimerização acompanhada de rompimento da ligação fosfoanidrido entre os fosfatos α e β, com liberação de PP_i (Fig. 14-12). Os segmentos transferidos para o polímero em crescimento nessas reações são adenilato (AMP), guanilato (GMP), citidilato (CMP) ou uridilato (UMP) para a síntese de RNA, e seus "desoxi-" análogos (com TMP substituindo UMP) para a síntese de DNA. Conforme mencionado, a ativação dos aminoácidos para a síntese de proteínas envolve a transferência de grupos adenilato do ATP; posteriormente será abordado o fato de que a formação de ligações peptídicas sobre os ribossomos é acompanhada também de hidrólise do GTP (Capítulo 27). Em todos esses casos, o rompimento exergônico de um nucleosídeo trifosfato está acoplado ao processo endergônico de síntese de um polímero de seqüência ordenada.

O ATP energiza o transporte ativo e a contração muscular

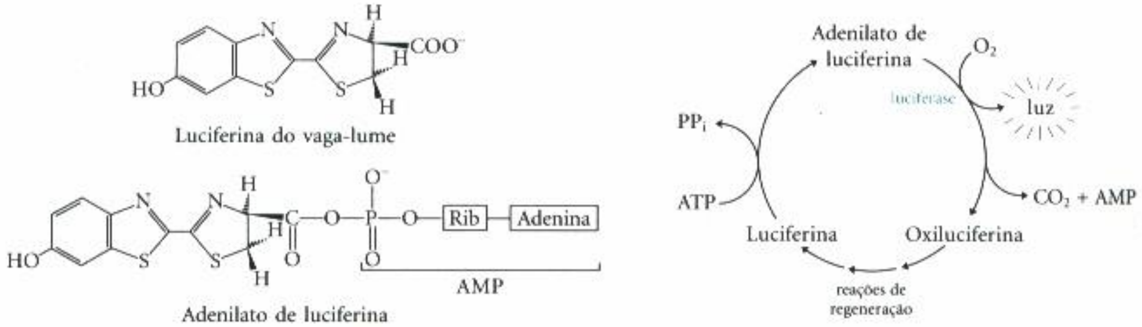
O ATP pode fornecer energia para o transporte de íons ou moléculas, através da membrana, de um determinado compartimento aquoso para outro no qual as suas concentrações são mais elevadas (veja Fig. 12-30). Os processos de transporte são os maiores consumidores de energia. Nos rins e cérebro humanos, por exemplo, dois terços da energia consumida durante o repouso são utilizados para bombear Na^+ e K^+ através de membranas plasmáticas, um processo que é intermediado pela Na^+K^+-ATPase. O transporte de Na^+ e K^+ é impulsionado pela fosforilação e desfosforilação cíclica da proteína transportadora, tendo o ATP como doador de grupo fosforil (veja Fig. 12-34). A fosforilação Na^+-dependente da Na^+K^+-ATPase induz a uma alteração na conformação da proteína e uma desfosforilação K^+-dependente favorece o retorno à conformação original. Cada ciclo no processo de transporte resulta na conversão de ATP em ADP e P_i, sendo a variação de energia livre da hidrólise do ATP responsável pela indução de alterações cíclicas na conformação da proteína e conseqüente bombeamento eletrogênico de Na^+ e K^+. Note que, neste caso, o ATP interage covalentemente transferindo grupo fosforil à enzima, não ao substrato.

Adendo 14-3 O relampear dos vaga-lumes: relatos brilhantes do ATP

A bioluminescência necessita de uma quantidade considerável de energia. No vaga-lume, o ATP é utilizado em uma variedade de reações que convertem energia química em energia luminosa. De milhares de vaga-lumes coletados por crianças nas imediações de Baltimore, William McElroy e seus colaboradores da Universidade Johns Hopkins isolaram os principais componentes bioquímicos: a luciferina, um ácido carboxílico complexo, e a luciferase, uma enzima. A emissão de um lampejo requer a ativação da luciferina por meio de uma reação enzimática envolvendo a quebra do ATP em pirofosfato com formação de adenilato de luciferina. Em presença de oxigênio molecular e luciferase, a luciferina sofre um processo gradual de descarboxilação oxidativa a oxiluciferina. Esse processo é acompanhado por emissão de luz. A cor dos lampejos difere em função da espécie de vaga-lume e parece ser determinada por diferenças na estrutura da luciferase. Por uma série de reações subseqüentes, a luciferina é regenerada a partir da oxiluciferina.

Em laboratório, luciferina e luciferase purificadas de vaga-lume possibilitam, em função da intensidade luminosa produzida, medir quantidades de ATP tão pequenas quanto alguns poucos picomoles (10^{-12} mol). Uma extensão ilustrativa dos estudos com luciferase é a clonagem de seu gene em plantas de tabaco. Quando irrigadas com uma solução contendo luciferina, essas plantas fosforescem no escuro (veja Fig. 29-20).

O vaga-lume, um besouro da família Lampyridae.



Luciferina do vaga-lume

Adenilato de luciferina

Componentes importantes que participam do ciclo de bioluminescência do vaga-lume.

No sistema contrátil das células do músculo esquelético, a miosina e a actina são proteínas especializadas em transduzir a energia química do ATP em movimento (veja Fig. 7-33). O ATP liga-se fortemente, embora não-covalentemente, a uma conformação da miosina, mantendo-a nessa conformação. Quando a miosina catalisa a hidrólise do ATP ligado, o ADP e P_i dissociam-se da proteína permitindo o seu relaxamento em uma outra conformação, que se mantém até a ligação de uma outra molécula de ATP. A ligação e a subseqüente hidrólise do ATP (pela miosina ATPase) fornecem a energia que induz a alterações cíclicas na conformação da cabeça da molécula de miosina. A alteração na conformação de várias moléculas individuais de miosina resulta no deslizamento das fibrilas da proteína ao longo dos filamentos de actina (veja Fig. 7-32), promovendo a contração macroscópica da fibra muscular. Essa produção de movimento mecânico à custa do ATP é, conforme mencionado anteriormente, um dos poucos casos em que a hidrólise do ATP por si, e não a transferência de grupo do ATP, é a fonte de energia química em um processo acoplado.

As transfosforilações entre os nucleotídeos ocorrem em todos os tipos de células

Embora o ATP tenha sido definido como a moeda de energia da célula e o doador de grupos fosforil, todos os outros nucleosídeos trifosfato (GTP, UTP e CTP) e todos os desoxinucleosídeos trifosfato (dATP, dGTP, dTTP e dCTP) são energeticamente equivalentes ao ATP. As variações de energia livre que acompanham a hidrólise de suas ligações fosfoanidrido são bastante semelhantes àquelas apresentadas na Tabela 14-6 para o ATP. Na preparação para as suas diferentes funções biológicas, esses outros nu-

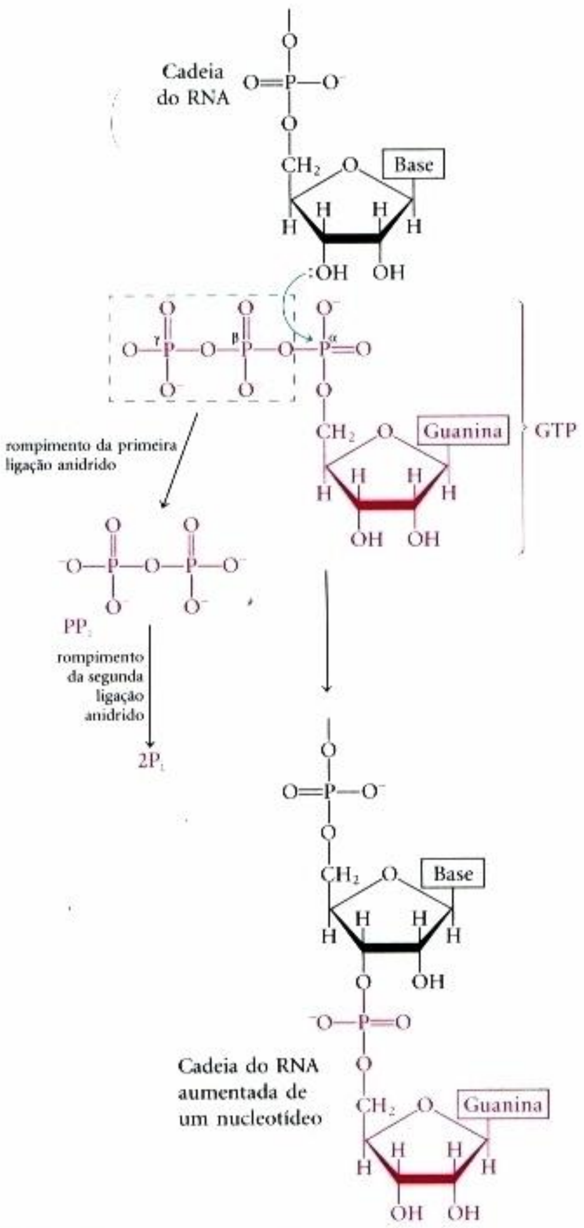

Cadeia do RNA
Base
:OH
OH
γ
β
α
Guanina
GTP
rompimento da primeira ligação anidrido
PP_i
rompimento da segunda ligação anidrido
$2P_i$
Base
Cadeia do RNA aumentada de um nucleotídeo
Guanina

Figura 14-12 – Nucleosídeos trifosfato na síntese do RNA. Com cada nucleosídeo monofosfato adicionado à cadeia em crescimento, um PP_i é liberado e hidrolisado a dois P_i. A hidrólise de duas ligações fosfoanidrido para cada nucleotídeo adicionado fornece a energia para a formação das ligações no polímero de RNA e para a montagem de uma seqüência ordenada de nucleotídeos.

cleotídeos são formados e mantidos como nucleosídeos trifosfato (NTP) mediante transferência do grupo fosforil aos nucleosídeos difosfato (NDPs) e monofosfato (NMPs) correspondentes.

O ATP é o composto fosfato de alta energia primário produzido pelo catabolismo na glicólise, fosforilação oxidativa e, em células fotossintéticas, na fotofosforilação. Diversas enzimas transferem grupos fosforil do ATP para outros nucleotídeos. A **nucleosídeo difosfato quinase**, encontrada em todas as células, catalisa a reação

$$\text{ATP} + \text{NDP (ou dNDP)} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{NTP (ou dNTP)} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Embora esta reação seja totalmente reversível, a razão [ATP]/[ADP] relativamente alta nas células, normalmente, impulsiona a reação para a direita, com a nova formação de NTPs e dNTPs. A enzima, na realidade, catalisa uma transferência de grupo fosforil em duas etapas. Primeiramente, a transferência do grupo fosforil do ATP para um resíduo de His do sítio ativo produz uma fosfoenzima intermediária; o grupo fosforil é então transferido do resíduo de Ⓟ-His para um receptor de NDP. Por ser a enzima não específica para a base no NDP, atuando com a mesma eficiência sobre NDPs e dNDPs, ela é capaz de sintetizar todos os NTPs e dNTPs, gerando os NDPs correspondentes e um suprimento de ATP.

Quando ocorre acúmulo de ADP decorrente da transferência de grupos fosforil do ATP, como no caso de uma contração muscular vigorosa, o ADP interfere na contração dependente de ATP. Nesse caso, a **adenilato quinase** remove ADP por meio da reação

$$2\text{ADP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ATP} + \text{AMP} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Esta reação é totalmente reversível, de tal forma que a enzima pode converter também AMP (produzido pela transferência de grupos pirofosforil ou adenilil do ATP) em ADP, que pode então ser fosforilado a ATP por meio de uma das vias catabólicas. Uma enzima semelhante, a guanilato quinase, converte GMP em GDP à custa de ATP. Por meio de vias como essas, a energia conservada na produção catabólica do ATP é utilizada para suprir a célula com todos os NTPs e dNTPs necessários.

A fosfocreatina (Fig. 14-5), também denominada creatina fosfato, é uma fonte de grupos fosforil para uso imediato, promovendo a formação rápida de ATP a partir do ADP. A concentração de fosfocreatina (PCr) no músculo esquelético é de aproximadamente 30mM, quase dez vezes superior à concentração de ATP, e em outros tecidos tais como músculo liso, cérebro e rim é de 5 a 10mM. A enzima **creatina quinase** catalisa a reação reversível

$$\text{ADP} + \text{PCr} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ATP} + \text{Cr} \qquad \Delta G'^{\circ} = -12{,}5\text{kJ/mol}$$

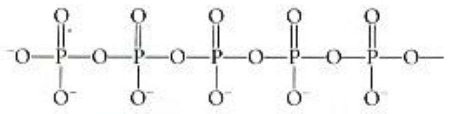
Quando uma súbita demanda por energia esgota o ATP, o reservatório de PCr o repõe a uma velocidade consideravelmente superior àquela pela qual ele é sintetizado por meio das vias catabólicas. Quando a demanda por energia diminui, o ATP produzido pelo catabolismo é utilizado para repor o reservatório de PCr por meio do reverso da reação da creatina quinase. Organismos inferiores utilizam outras moléculas do tipo da PCr (denominadas coletivamente de **fosfagens**) como reservatórios de grupos fosforil.

O polifosfato inorgânico é um doador potencial de grupos fosforil

O polifosfato inorgânico (poliP) é um polímero linear composto por centenas de resíduos de P_i ligados por meio de ligações fosfoanidrido. Esse polímero, presente nas células de todos os organismos, possui aproximadamente o mesmo potencial de transferência de grupos fosforil do PP_i; a sua função biológica ainda não é conhecida. Na *Escherichia coli*, poliP é acumulado quando as células estão crescendo em meio com excesso de P_i, sendo que esse acúmulo representa uma vantagem para a sobrevivência durante períodos de estresse nutricional ou oxidativo. A enzima **polifosfato quinase** catalisa a reação

$$\text{ATP} + \text{poliP}_n \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{poliP}_{n+1} \qquad \Delta G'^{\circ} = -20\text{kJ/mol}$$

por meio de mecanismo envolvendo um intermediário fosfoistidina ligado à enzima (relembrar o mecanismo da nucleosídio difosfato quinase, descrito anteriormente). Pelo fato de a reação ser reversível, o poliP (tal qual o PCr) poderia servir como reservatório de grupos fosforil, ou ainda como um doador de grupos



Polifosfato inorgânico (poliP)

fosforil análogo ao ATP no que se refere às transferências catalisadas por quinases. O menor polifosfato, PP_i ($n = 2$), pode servir como fonte de energia para o transporte ativo de H^+ em vacúolos de plantas. O PP_i é também o habitual doador de grupos fosforil para pelo menos uma forma da enzima fosfofrutoquinase em plantas, uma função normalmente exercida pelo ATP em animais e microrganismos (pág. 413). A descoberta de elevadas concentrações de poliP em condensados e vapores vulcânicos sugere que ele poderia ter servido como fonte de energia na evolução celular pré-biótica e primitiva.

As equações bioquímicas e químicas não são idênticas

Bioquímicos escrevem equações metabólicas em uma forma simplificada, particularmente as reações envolvendo o ATP. Compostos fosforilados podem existir em diferentes estados de ionização, e, conforme já mencionado, as diferentes espécies podem ligar Mg^{2+}. Por exemplo, em pH 7,0 e concentração de Mg^{2+} igual a 2mM, o ATP encontra-se nas formas ATP^{4-}, $HATP^{3-}$, H_2ATP^{2-}, $MgHATP^-$ e Mg_2ATP. Entretanto, quando se considera a função biológica do ATP, nem sempre todos esses detalhes são relevantes, podendo o termo ATP representar todas as espécies envolvidas. Portanto, a sua hidrólise pode ser representada pela equação bioquímica

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i$$

na qual ATP, ADP e P_i correspondem aos somatórios das espécies. A constante de equilíbrio aparente

$$K'_{eq} = [ADP][P_i]/[ATP]$$

depende do pH e da concentração de Mg^{2+} livre. Pode-se observar que H^+ e Mg^{2+} não aparecem na equação bioquímica porque eles são mantidos constantes. Assim, uma equação bioquímica não inclui o balanceamento de H, Mg ou carga, embora ela inclua o balanceamento de todos os outros elementos envolvidos na reação (C, N, O e P na equação citada).

Pode-se escrever uma equação química incluindo o balanceamento de todos os elementos e cargas. Por exemplo, quando o ATP é hidrolisado em valores de pH acima de 8,5 na ausência de Mg^{2+}, a reação química é representada por

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

A constante de equilíbrio correspondente

$$K'_{eq} = [ADP^{3-}][HPO_4^{2-}][H^+]/[ATP^{4-}]$$

depende somente da temperatura, pressão e força iônica.

Ambas as formas de se escrever uma reação metabólica são relevantes em bioquímica. Assim, equações químicas são utilizadas quando se precisa levar em consideração todos os átomos e cargas na reação, como no caso da análise de mecanismos envolvidos. Equações bioquímicas são utilizadas para estabelecer em qual sentido a reação ocorrerá espontaneamente, dado um valor específico de pH e $[Mg^{2+}]$, ou para calcular a constante de equilíbrio dessa reação.

Neste livro serão utilizadas as equações bioquímicas, a não ser quando enfocarmos o mecanismo químico envolvido, além de valores de $\Delta G'^{\circ}$ e K'_{eq} determinados em pH 7,0 e na presença de Mg^{2+} 1mM.

Reações Biológicas de Oxidação-Redução

A transferência de grupos fosforil é um evento central no metabolismo. Igualmente importante é a transferência de elétrons em reações de oxidação-redução. Essas reações envolvem a perda de elétrons por uma determinada espécie química, que sofre oxidação, e a captação de elétrons por uma outra espécie química, que sofre redução. O fluxo de elétrons em reações de oxidação-redução é responsável, direta ou indiretamente, por todos os trabalhos realizados pelos organismos vivos. Em organismos não-fotossintéticos, as fontes de elétrons são compostos reduzidos (alimentos); em organismos fotossintéticos, o doador inicial de elétrons é uma espécie química excitada por absorção de luz. A via de transporte de elétrons no metabolismo é complexa. Os elétrons movem-se de diferentes intermediários metabólicos para carreadores de elétrons especializados, por meio de reações catalisadas enzimaticamente. Os carreadores, por sua vez, doam-nos a receptores com maior afinidade por elétrons, liberando energia. As células contêm uma variedade de transdutores moleculares de energia, que convertem a energia do fluxo de elétrons em trabalho útil.

Nossa discussão terá início com a descrição dos tipos gerais de reações metabólicas que envolvem a transferência de elétrons. Após a consideração das bases teóricas e experimentais para medir as alterações de energia nas reações de oxidação, em termos de força eletromotiva, será discutida a relação entre essa força, expressa em volts, e a variação de energia livre, expressa em joules. Concluiremos com a discussão das estruturas e da química de oxidação-redução dos mais comuns dos transportadores de elétrons especializados, que serão mencionados freqüentemente nos próximos capítulos.

O fluxo de elétrons pode realizar trabalho biológico

Sempre que se liga um motor, a luz elétrica ou o aquecedor, ou ainda quando uma faísca promove a combustão da gasolina em um motor de veículo, o fluxo de elétrons é utilizado para realizar trabalho. No circuito que impulsiona um motor, a fonte de elétrons pode ser uma bateria contendo duas espécies químicas que diferem na afinidade por elétrons. Os fios elétricos fornecem um caminho para o fluxo de elétrons de uma espécie química em um pólo da bateria, por meio do motor, para a espécie química no outro pólo da bateria. Pelo fato de as duas espécies químicas diferirem em suas afinidades por elétrons, estes fluem espontaneamente por meio do circuito, conduzidos por uma força proporcional à diferença na eletroafinidade, a **força eletromotiva (fem)**. A força eletromotiva (tipicamente alguns poucos volts) pode realizar trabalho caso um transdutor de energia apropriado, nesse caso um motor, seja incluído no circuito. O motor pode estar acoplado a uma variedade de dispositivos mecânicos capazes de realizar trabalho útil.

As células vivas possuem um "circuito" biológico análogo, sendo que um composto relativamente reduzido, a glicose, é a fonte de elétrons. A glicose é oxidada enzimaticamente e os elétrons liberados fluem espontaneamente por meio de uma série de carreadores intermediários, para uma outra espécie química, tal como o O_2. Esse fluxo é exergônico porque o O_2 possui maior afinidade por elétrons do que os carreadores intermediários. A força eletromotiva resultante fornece energia para uma variedade de transdutores moleculares (enzimas e outras proteínas), os quais realizam trabalho biológico. Na mitocôndria, por exemplo, enzimas ligadas à membrana acoplam o fluxo de elétrons à geração de uma diferença de pH transmembrana, realizando trabalho elétrico e osmótico. O gradiente de prótons assim formado possui energia potencial, algumas vezes denominada força próton motiva por analogia com a força eletromotiva. Uma outra enzima, a ATP sintase na membrana mitocondrial interna, utiliza a força próton motiva para realizar trabalho químico, qual seja, a síntese de ATP a partir de ADP e P_i, à medida que os prótons fluem espontaneamente através da membrana. De forma semelhante, na *E. coli*, enzimas localizadas na membrana convertem a força eletromotiva em força próton motiva, utilizada para potencializar o movimento flagelar.

Os princípios da eletroquímica que determinam as alterações energéticas no circuito macroscópico compreendido por um motor e bateria aplicam-se, com igual validade, aos processos moleculares associados ao fluxo de elétrons nas células vivas. Esses princípios serão examinados a seguir.

Oxidação-redução pode ser descrita na forma de meia-reação

Embora oxidação e redução ocorram conjuntamente, é conveniente que, na descrição da transferência de elétrons, as duas metades de uma reação de oxidação-redução sejam representadas separadamente. Por exemplo, a oxidação do íon ferroso pelo íon cúprico

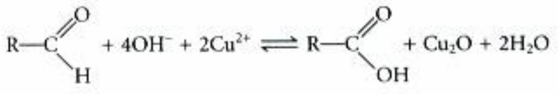
$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^{+}$$

pode ser descrita em termos de duas meias-reações:

$$(1)\ Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^-$$
$$(2)\ Cu^{2+} + e^- \rightleftharpoons Cu^{+}$$

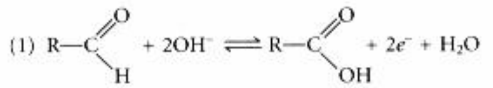
A molécula doadora de elétrons em uma reação de oxidação-redução é denominada agente redutor, ou simplesmente redutor; a molécula receptora de elétrons é o agente oxidante, ou simplesmente oxidante. Um determinado agente, tal como um cátion ferro existente nos estados ferroso (Fe^{2+}) ou férrico (Fe^{3+}), funciona como um par oxidante-redutor conjugado (par redox), da mesma forma que um ácido e a sua base correspondente funcionam como um par ácido-base conjugado. Relembre do Capítulo 4 que para uma reação ácido-base pode escrever-se a seguinte reação geral: doador de prótons $\rightleftharpoons$ H^+ + receptor de prótons. Para as reações redox pode-se escrever uma reação geral semelhante: doador de elétrons $\rightleftharpoons$ e^- + receptor de elétrons. Na meia-reação reversível (1) descrita acima, Fe^{2+} é o doador de elétrons enquanto Fe^{3+} é o receptor; juntos, Fe^{2+} e Fe^{3+} constituem um **par redox conjugado**.

As transferências de elétrons nas reações de oxidação-redução envolvendo compostos orgânicos não são fundamentalmente diferentes das que ocorrem com espécies inorgânicas. No Capítulo 9 foi apresentada a oxidação de um açúcar redutor (um aldeído ou cetona) pelo íon cúprico (veja Fig. 9-10a):



$$R{-}CHO + 4OH^- + 2Cu^{2+} \rightleftharpoons R{-}COOH + Cu_2O + 2H_2O$$

A reação total pode ser expressa na forma de duas meias-reações:



$$(1)\ R{-}CHO + 2OH^- \rightleftharpoons R{-}COOH + 2e^- + H_2O$$

$$(2)\ 2Cu^{2+} + 2e^- + 2OH^- \rightleftharpoons Cu_2O + H_2O$$

Como dois elétrons são removidos do carbono aldeído, a segunda meia-reação (a redução por um elétron do íon cúprico a cuproso) deve ser multiplicada por dois no balanceamento da equação total.

As oxidações biológicas freqüentemente envolvem desidrogenação

Nas células vivas, o carbono encontra-se em diferentes estados de oxidação (Fig. 14-13). Quando o átomo de carbono compartilha um par de elétrons com um outro átomo (tipicamente H, C, S, N ou O), o compartilhamento é desigual em favor do átomo mais eletronegativo (relembre a ordem crescente de eletronegatividade apresentada na Tabela 3-2: H < C < S < N < O). De forma simplificada, porém útil, pode-se considerar que o átomo mais eletronegativo "apropria-se" dos elétrons compartilhados com um outro átomo. Por exemplo, no metano (CH_4), o carbono é mais eletronegativo do que os quatro átomos de hidrogênio ligados a ele, portanto o átomo de C "apropria-se" de todos os oito elétrons (Fig. 14-13). No etano, os elétrons na ligação C—C são compartilhados igualmente, de tal forma que cada átomo de C "apropria-se" somente de sete dos oito elétrons. No etanol, o C-1 é menos eletronegativo do que o oxigênio ao qual ele está ligado, e o átomo de O, portanto, "apropria-se" de ambos os elétrons da ligação C—O, deixando o C-1 com somente cinco elétrons da ligação. Juntamente com cada perda formal de elétrons, o átomo de carbono sofre oxidação, ainda quando o oxigênio não está envolvido, como no caso da conversão de um alcano ($CH_2{-}CH_2$) em um alceno ($CH{-}CH$). Nesse caso, a oxidação (perda de elétrons) coincide com a perda de hidrogênio. Nos sistemas biológicos, oxidação é freqüentemente sinônimo de **desidrogenação** e muitas das enzimas que catalisam reações de oxidação são **desidrogenases**. Note que os compostos mais reduzidos na Figura 14-13 (no topo) são mais ricos em hidrogênio do que em oxigênio, enquanto os compostos mais oxidados (na base) possuem mais oxigênio do que hidrogênio.

Nem todas as reações de oxidação-redução biológicas envolvem carbono. Por exemplo, na conversão de nitrogênio molecular em amônia, $6H^+ + 6e^- + N_2 \rightarrow 2NH_3$, os átomos que sofrem redução são os de nitrogênio.

Os elétrons são transferidos de uma molécula (doadora de elétrons) para outra, por meio de uma das quatro formas a seguir:

1. Diretamente como *elétrons*. Por exemplo, o par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} pode transferir um elétron para o par redox Cu^{+}/Cu^{2+}:

   $$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^{+}$$

2. Como *átomos de hidrogênio*. Lembre-se de que um átomo de hidrogênio consiste de um próton (H^+) e um único elétron (e^-). Nesse caso, pode-se escrever a seguinte equação geral:

   $$AH_2 \rightleftharpoons A + 2e^- + 2H^+$$

   onde AH_2 é o doador de hidrogênio/elétrons (não confunda essa reação com a dissociação de um ácido, uma vez que o H^+ tem origem na remoção do átomo de hidrogênio, ou seja, $H^+ + e^-$). AH_2 e A constituem um par redox conjugado (A/AH_2), que pode reduzir um outro composto B (ou par redox, B/BH_2) pela transferência de átomos de hidrogênio:

   $$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$$

3. Como *íon hidreto* (:H^-), que possui dois elétrons. Isso ocorre no caso das desidrogenases ligadas a NAD, descritas a seguir.
4. Por *combinação* direta *com o oxigênio*. Nesse caso, o oxigênio combina-se com um redutor orgânico, sendo covalentemente incorporado ao produto, como no caso da oxidação de um hidrocarboneto a um álcool:

   $$R{-}CH_3 + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow R{-}CH_2{-}OH$$

   O hidrocarboneto é o doador de elétrons, enquanto o átomo de oxigênio é o receptor.

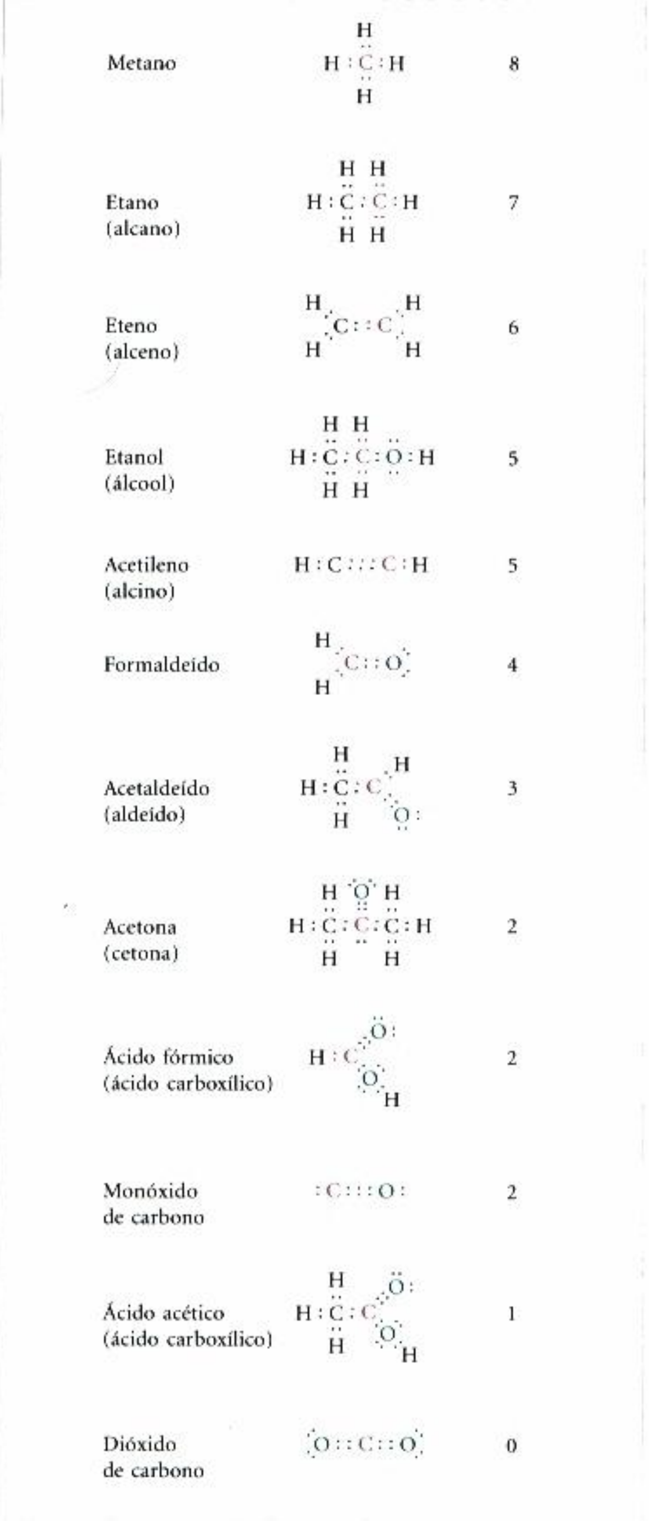


Figura 14-13 – Estados de oxidação do carbono presentes na biosfera. Os estados de oxidação são ilustrados com alguns compostos representativos. Concentre-se no átomo de carbono em vermelho e seus elétrons ligantes. Quando esse carbono se liga a um átomo de H menos eletronegativo, ambos os elétrons ligantes (em vermelho) são cedidos ao carbono. Quando o carbono é ligado a um outro carbono, os elétrons ligantes são compartilhados igualmente, de tal forma que um dos dois elétrons é cedido ao carbono em vermelho. Quando o carbono em vermelho é ligado ao átomo de O mais eletronegativo, os elétrons ligantes são cedidos ao oxigênio. O número à direita de cada composto é o número de elétrons "apropriado" pelo carbono em vermelho, uma expressão do seu estado de oxidação. Quando o carbono em vermelho sofre oxidação (perde elétrons), o número torna-se menor. Assim, a ordem crescente para o estado de oxidação é: alcano < alceno < álcool < alcino < aldeído < cetona < ácido carboxílico < dióxido de carbono.

Nas células ocorrem todos os quatro tipos de transferência de elétrons. O termo **equivalente redutor** é geralmente utilizado para designar um único equivalente eletrônico que participa de uma reação de oxidação-redução, independentemente de esse equivalente estar na forma de elétron, átomo de hidrogênio ou íon hidreto, ou, ainda, se a transferência de elétrons ocorre em uma reação com oxigênio liberando um produto oxigenado. Como as moléculas combustíveis biológicas geralmente sofrem desidrogenação enzimática perdendo *dois* equivalentes redutores de uma vez, e como cada átomo de oxigênio recebe dois equivalentes redutores, os bioquímicos, por convenção, referem-se à unidade de oxidação biológica como dois equivalentes redutores que se transferem do substrato para o oxigênio.

Os potenciais de redução medem a afinidade por elétrons

Quando dois pares redox conjugados estão presentes conjuntamente em solução, a transferência de elétrons do doador de um par para o receptor de elétrons do outro par pode ocorrer espontaneamente. A tendência para que a reação ocorra depende da afinidade relativa do receptor de elétrons de cada par redox. O **potencial de redução padrão, $E°$**, uma medida (em volts) dessa afinidade, pode ser determinado por experimento semelhante ao descrito na Figura 14-14. Os eletroquímicos escolheram como padrão de referência a seguinte meia-reação:

$$H^+ + e^- \longrightarrow \tfrac{1}{2}H_2$$

Ao elétrodo no qual essa meia-reação ocorre (denominado meia-célula), é atribuído, arbitrariamente, um potencial de redução padrão de 0,00V. Quando esse elétrodo de hidrogênio é conectado por meio de um circuito externo a outra meia-célula em que uma espécie oxidada e sua espécie reduzida correspondente estão presentes em concentrações-padrão (cada soluto em concentração 1M e cada gás sob pressão de 101,3kPa ou 1 atm), os elétrons tenderão a fluir por meio do circuito externo, da meia-célula com menor potencial de redução padrão para a meia-célula com maior potencial de redução padrão. Por convenção, à meia-célula com maior tendência para adquirir elétrons é atribuído um valor positivo para $E°$.

O potencial de redução de uma meia-célula depende não somente das espécies químicas presentes, mas também de suas atividades, cujos valores são comparáveis aos de suas concentrações. Há aproximadamente um século, Walther Nernst deduziu uma equação que relaciona o potencial de redução padrão ($E°$) ao potencial de redução (E) para quaisquer concentrações de espécies oxidadas e reduzidas na célula:

$$E = E° + \frac{RT}{n\mathcal{J}} \ln \frac{[\text{receptor de elétrons}]}{[\text{doador de elétrons}]} \qquad (14\text{-}4)$$

onde os valores de R e T são os já descritos, n corresponde ao número de elétrons transferidos por molécula e $\mathcal{J}$ é a constante de Faraday (Tabela 14-1). Para 298K (25°C), essa expressão é reduzida a:

$$E = E° + \frac{0{,}026\text{V}}{n} \ln \frac{[\text{receptor de elétrons}]}{[\text{doador de elétrons}]} \qquad (14\text{-}5)$$

Muitas meias-reações de interesse bioquímico envolvem prótons. Como na definição de $\Delta G'°$, os bioquímicos definem o estado padrão para reações de oxidação-redução como pH 7,0 e expressam potencial de redução como $E'°$ o potencial de redução padrão em pH 7,0. Os potenciais de redução padrão apresentados na Tabela 14-7 e utilizados neste livro são valores de $E'°$, sendo válidos portanto somente para sistemas em pH neutro. Cada valor representa a diferença de potencial quando o par redox conjugado, em concentrações 1M e pH 7,0, é conectado

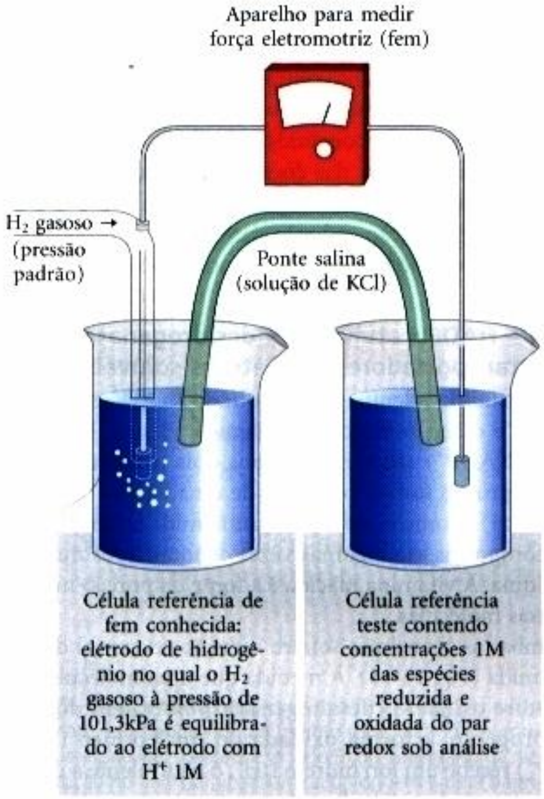

Aparelho para medir
força eletromotriz (fem)
H₂ gasoso →
(pressão
padrão)
Ponte salina
(solução de KCl)
Célula referência de fem conhecida: elétrodo de hidrogênio no qual o H₂ gasoso à pressão de 101,3kPa é equilibrado ao elétrodo com H⁺ 1M
Célula referência teste contendo concentrações 1M das espécies reduzida e oxidada do par redox sob análise

Figura 14-14 – Medida do potencial de redução padrão (E'°) de um par redox. Os elétrons fluem do elétrodo teste para o elétrodo de referência, ou vice-versa. A meia-célula de referência final é o elétrodo de hidrogênio, conforme mostrado nesta figura. O valor de 0,00V é atribuído à força eletromotiva (fem) desse elétrodo. Em pH 7,0, o valor de E'° para o elétrodo de hidrogênio é –0,414V. O sentido do fluxo dos elétrons depende da sua "pressão" relativa ou do potencial das duas células. Uma ponte salina contendo solução de KCl saturado fornece um caminho para a movimentação dos íons entre a célula teste e a de referência. A partir da fem encontrada e conhecendo-se a fem da célula de referência, é possível determinar a fem da célula teste contendo o par redox em análise. A célula que recebe elétrons apresenta, por convenção, o potencial de redução mais positivo.

Tabela 14-7 – Potenciais de redução padrão de algumas meias-reações biologicamente importantes a 25°C, em pH 7,0

Meia-reação	E'° (V)
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$	0,816
$Fe^{3+} + e^- \longrightarrow Fe^{2+}$	0,771
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$	0,421
Citocromo *f* (Fe^{3+}) + e^- $\longrightarrow$ citocromo *f* (Fe^{2+})	0,365
$Fe(CN)_6^{3-}$ (ferricianeto) + e^- $\longrightarrow$ $Fe(CN)_6^{4-}$	0,36
Citocromo a_3 (Fe^{3+}) + e^- $\longrightarrow$ citocromo a_3 (Fe^{2+})	0,35
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O_2$	0,295
Citocromo *a* (Fe^{3+}) + e^- $\longrightarrow$ citocromo *a* (Fe^{2+})	0,29
Citocromo *c* (Fe^{3+}) + e^- $\longrightarrow$ citocromo *c* (Fe^{2+})	0,254
Citocromo c_1 (Fe^{3+}) + e^- $\longrightarrow$ citocromo c_1 (Fe^{2+})	0,22
Citocromo *b* (Fe^{3+}) + e^- $\longrightarrow$ citocromo *b* (Fe^{2+})	0,077
Ubiquinona + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ ubiquinol + H_2	0,045
Fumarato^{2-} + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ succinato^{2-}	0,031
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ (nas condições-padrão, pH 0)	0,000
Crotonil-CoA + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ butiril-CoA	–0,015
Oxaloacetato^{2-} + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ malato^{2-}	–0,166
Piruvato$^-$ + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ lactato$^-$	–0,185
Acetaldeído + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ etanol	–0,197
$FAD + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow FADH_2$	–0,219*
Glutationa + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ 2 glutationa reduzida	–0,23
$S + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2S$	–0,243
Ácido lipóico + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ ácido diidrolipóico	–0,29
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH$	–0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADPH$	–0,324
Acetoacetato + $2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ β-hidroxibutirato	–0,346
α-Cetoglutarato + $CO_2 + 2H^+ + 2e^-$ $\longrightarrow$ isocitrato	–0,38
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ (em pH 7,0)	–0,414
Ferredoxina (Fe^{3+}) + e^- $\longrightarrow$ ferredoxina (Fe^{2+})	–0,432

Dados extraídos em sua maior parte de Loach PA. (1976) In *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (Fasman GD, ed), *Physical and Chemical Data*, Vol. I, pp. 122-130, CRC Press, Boca Raton, FL.

*Este valor é para o FAD livre. FAD ligado a uma flavoproteina específica (por exemplo, succinato desidrogenase) apresenta E'° diferente.

com o elétrodo de hidrogênio padrão (pH 0). Observe na Tabela 14-7 que, quando o par conjugado $2H^+/H_2$ em pH 7,0 é conectado com o elétrodo de hidrogênio padrão (pH 0), os elétrons tendem a fluir da célula em pH 7,0 para a célula-padrão (pH 0); o valor de E'° medido para o par $2H^+/H_2$ é –0,414V.

Os potenciais de redução padrão podem ser utilizados para calcular a variação de energia livre

Os potenciais de redução são parâmetros úteis uma vez que a determinação do valor correspondente a uma de duas meias-células em relação ao elétrodo de hidrogênio padrão possibilita conhecer o valor em relação à outra meia-célula. Pode-se assim predizer o sentido no qual os elétrons tenderão a fluir quando as duas meias-células estiverem conectadas por meio de um circuito externo, ou ainda quando os componentes de ambas as meias-células estiverem presentes na mesma solução. Os elétrons tendem a fluir para a meia-célula com o valor de E mais positivo, sendo essa tendência proporcional à diferença nos potenciais de redução, ΔE.

A energia que se torna disponível por meio desse fluxo espontâneo de elétrons (a variação de energia livre para a reação de oxidação-redução) é proporcional a ΔE:

$$\Delta G = -n\mathcal{F}\,\Delta E \quad \text{ou} \quad \Delta G'^{\circ} = -n\mathcal{F}\,\Delta E'^{\circ} \tag{14-6}$$

Neste caso, n representa o número de elétrons transferidos na reação. Com esta equação é possível calcular a variação da energia livre para qualquer reação de oxidação-redução, a partir dos valores de E'° (veja Tabela 14-7) e das concentrações das espécies envolvidas na reação.

Considere a reação na qual o acetaldeído é reduzido pelo transportador biológico de elétrons NADH:

$$\text{Acetaldeído} + NADH + H^+ \longrightarrow \text{etanol} + NAD^+$$

As meias-reações envolvidas e seus valores de E'° são:

$$\begin{array}{lll} (1) & \text{Acetaldeído} + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow \text{etanol} & E'^{\circ} = -0{,}197V \\ (2) & NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH + H^+ & E'^{\circ} = -0{,}320V \end{array}$$

Por convenção, $\Delta E'^{\circ}$ é expresso como E'° do receptor de elétrons menos E'° do doador de elétrons. Pelo fato de o acetaldeído receber elétrons do NADH, neste exemplo, $\Delta E'^{\circ} = -0{,}197V - (-0{,}320V) = 0{,}123V$, e $n = 2$. Portanto,

$$\Delta G'^{\circ} = -n\mathcal{F}\,\Delta E'^{\circ} = -2(96{,}5kJ/V \cdot mol)(0{,}123V) = -23{,}7kJ/mol$$

Esta é a variação de energia livre para a reação de oxidação-redução em pH 7,0 quando acetaldeído, etanol, NAD^+ e NADH estão presentes em concentrações iguais a 1M. Caso as concentrações de acetaldeído e NADH forem 1M, mas as de etanol e

NAD^+ forem 0,1M, o valor de ΔG pode ser calculado como segue. Primeiro, são determinados os valores de E para ambos os redutores (Eq. 14-4):

$$\begin{aligned}E_{\text{acetaldeído}} &= E'^{\circ} + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{[\text{acetaldeído}]}{[\text{etanol}]}\\ &= -0{,}197\text{V} + \frac{0{,}026\text{V}}{2} \ln \frac{1{,}0}{0{,}1} = -0{,}167\text{V}\\ E_{\text{NADH}} &= E'^{\circ} + \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]}\\ &= -0{,}320\text{V} + \frac{0{,}026\text{V}}{2} \ln \frac{0{,}1}{1{,}0} = -0{,}350\text{V}\end{aligned}$$

ΔE é então utilizado para calcular ΔG (Eq. 14-5):

$$\begin{aligned}\Delta E &= -0{,}167\text{V} - (-0{,}350)\text{V} = 0{,}183\text{V}\\ \Delta G &= -n\mathcal{F}\,\Delta E\\ &= -2(96{,}5\text{kJ/Vmol})(0{,}183\text{V})\\ &= -35{,}3\text{kJ/mol}\end{aligned}$$

Assim, é possível calcular a variação de energia livre para qualquer reação redox biológica e em quaisquer concentrações dos pares redox.

A oxidação celular da glicose a dióxido de carbono requer transportadores de elétrons especializados

Os princípios da energética de oxidação-redução descritos anteriormente se aplicam a um grande número de reações metabólicas que envolvem transferência de elétrons. Por exemplo, em muitos organismos, a oxidação da glicose fornece energia para a produção de ATP. A oxidação completa da glicose:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

apresenta $\Delta G'^{\circ}$ igual a −2,840kJ/mol. Este valor indica uma liberação de energia livre muito maior do que a energia que é necessária para a síntese do ATP (50 a 60kJ/mol; veja Adendo 14-2). As células não convertem glicose em CO_2 por meio de uma única reação com grande liberação de energia, mas sim por meio de uma série de reações controladas, algumas delas, reações de oxidação. A energia livre liberada nessas etapas de oxidação é da mesma ordem de grandeza da energia que é necessária para a síntese de ATP a partir de ADP, com uma fração excedente. Os elétrons removidos nessas etapas de oxidação são transferidos para coenzimas especializadas em transportar elétrons, tais como o NAD^+ e o FAD, apresentados a seguir.

Poucos tipos de coenzimas e proteínas atuam como transportadores universais de elétrons

O grande número de enzimas que catalisam as oxidações celulares direcionam os elétrons removidos de centenas de diferentes substratos a apenas alguns poucos tipos de transportadores universais de elétrons. A redução desses transportadores nos processos catabólicos é responsável pela conservação da energia livre liberada pela oxidação dos substratos. Os nucleotídeos NAD^+, $NADP^+$, FMN e FAD são coenzimas hidrossolúveis que sofrem oxidações e reduções reversíveis em muitas das reações metabólicas de transferência de elétrons. Os nucleotídeos NAD^+ e $NADP^+$ movem-se facilmente de uma enzima para outra, enquanto os nucleotídeos de flavina FMN e FAD encontram-se fortemente ligados às enzimas, denominadas flavoproteínas, atuando como grupos prostéticos. Quinonas solúveis em lipídios, tais como ubiquinona e plastoquinona, atuam como carreadores de elétrons e doadores de prótons no meio não aquoso das membranas. Proteínas ferro-enxofre e citocromos, que possuem grupos prostéticos fortemente ligados, capazes de sofrer oxidação e redução reversíveis, também atuam como carreadores de elétrons em diversas reações de oxidação-redução. Algumas dessas proteínas são solúveis em água, enquanto outras se encontram na periferia das membranas ou nelas inseridas (veja Fig. 12-11).

Este capítulo será concluído com a descrição de algumas características químicas das coenzimas nucleotídeo e de algumas enzimas (desidrogenases e flavoproteínas) que as utilizam. A química de oxidação-redução das quinonas, proteínas ferro-enxofre e citocromos será discutida no Capítulo 19.

NADH e NADPH atuam com desidrogenases como transportadores de elétrons solúveis

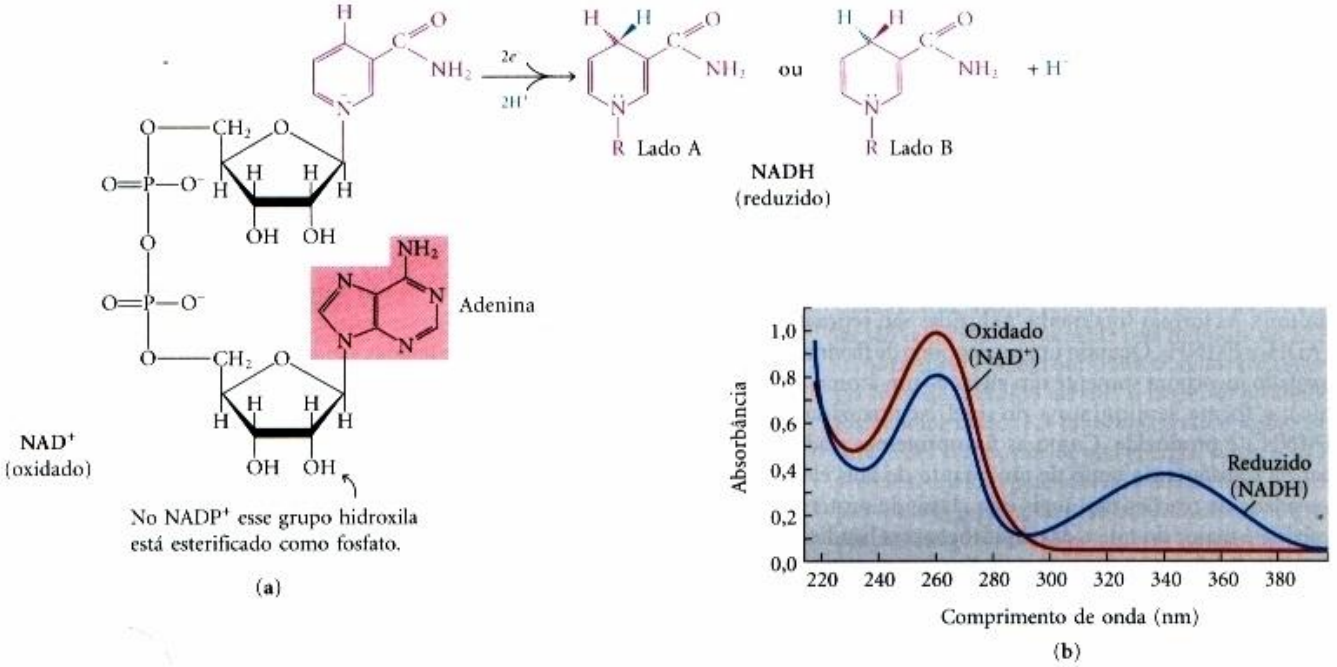
A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ em sua forma oxidada) e o seu análogo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+$) são formados por dois nucleotídeos ligados por seus grupos fosfato por meio de uma ligação fosfoanidrido (Fig. 14-15). Como o anel de nicotinamida lembra a piridina, esses compostos são algumas vezes denominados nucleotídeos de piridina. A vitamina niacina é a fonte da porção nicotinamida nessas moléculas.

Ambas as coenzimas sofrem redução reversível do anel nicotinamida (Fig. 14-15). À medida que uma molécula de substrato sofre oxidação (desidrogenação), liberando dois átomos de hidrogênio, a forma oxidada do nucleotídeo (NAD^+ ou $NADP^+$) recebe um íon hidreto (:H^-, o equivalente a um próton e dois elétrons), sendo transformada na sua forma reduzida (NADH ou NADPH). O segundo próton removido do substrato é liberado no solvente aquoso. A meia-reação para cada tipo de nucleotídeo é, portanto:

$$NAD^+ + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NADH + H^+$$
$$NADP^+ + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NADPH + H^+$$

A redução do NAD^+ ou $NADP^+$ converte o anel benzenóide da porção nicotinamida (com uma carga positiva fixada no anel de nitrogênio) à forma quinonóide (nitrogênio sem carga). Observe que os nucleotídeos reduzidos, mas não os oxidados, absorvem luz em 340nm (Fig. 14-15b). O sinal de adição nas abreviações de NAD^+ e $NADP^+$ *não* indica a carga líquida dessas moléculas (ambas são carregadas negativamente), mas sim que o anel nicotinamida se encontra em sua forma oxidada, com uma carga positiva no átomo de nitrogênio. Nas abreviações NADH e NADPH, o "H" indica o íon hidreto adicionado. Para referir-se a esses nucleotídeos sem especificar os seus estados de oxidação, são utilizadas as abreviações NAD e NADP.

Na maioria dos tecidos, a concentração total de NAD^+ + NADH é em torno de 10^{-5}M, enquanto a de $NADP^+$ + NADPH é aproximadamente dez vezes inferior. Em muitas células e tecidos, a razão NAD^+ (oxidado)/NADH (reduzido) é elevada, favorecendo assim a transferência do íon hidreto de um substrato *para* o NAD^+ formando NADH. Por outro lado, o NADPH (reduzido) geralmente se encontra presente em quantidades superiores às de sua forma oxidada, o $NADP^+$, favorecendo a transferência do íon hidreto *do* NADPH para o substrato. Isso reflete as funções metabólicas especializadas das duas coenzimas, ou seja, o NAD^+ atua em oxidações, geralmente associadas a processos catabólicos, enquanto o NADPH é utilizado em reduções, geralmente associadas a processos anabólicos. Poucas enzimas conseguem utilizar ambas as coenzimas; a maioria delas revela uma forte preferência por uma em relação à outra. Essa especialização funcional possibilita que a célula mantenha dois conjuntos distintos de transportadores de elétrons, com duas funções também distintas, presentes no mesmo compartimento celular.



No NADP⁺ esse grupo hidroxila está esterificado como fosfato.

(a)

(b)

Figura 14-15 – NAD e NADP. (**a**) A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e seu análogo fosforilado, NADP⁺, sofrem redução a NADH e NADPH, respectivamente, recebendo um íon hidreto (dois elétrons e um próton) de um substrato oxidável. O íon hidreto é adicionado tanto ao lado anterior (o lado A) quanto ao lado posterior (o lado B) do anel plano da nicotinamida (veja Tabela 14-8). (**b**) O espectro de absorção de NAD⁺ e NADH na região do UV. A redução do anel da nicotinamida dá origem a uma banda de absorção de luz ampla, com pico em 340nm. A geração de NADH durante uma reação enzimática pode ser monitorada pelo aparecimento dessa banda; $\varepsilon_{340} = 6.200\,M^{-1}cm^{-1}$.

São conhecidas mais de 200 enzimas que catalisam reações nas quais NAD^+ (ou $NADP^+$) incorpora um íon hidreto a partir de um substrato reduzido, ou NADPH (ou NADH) doa um íon hidreto para um substrato **oxidado**. As reações gerais são

$$AH_2 + NAD^+ \longrightarrow A + NADH + H^+$$
$$A + NADPH + H^+ \longrightarrow AH_2 + NADP^+$$

onde AH_2 é o substrato reduzido, e A, o substrato oxidado. Enzimas desse tipo constituem as **oxidorredutases**, também denominadas **desidrogenases**. Por exemplo, a álcool desidrogenase catalisa a primeira etapa no catabolismo do etanol, na qual ele é oxidado a acetaldeído:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \longrightarrow \underset{\text{Acetaldeído}}{CH_3CHO} + NADH + H^+$$

Observe que um dos átomos de carbono no etanol perde um hidrogênio, sendo o composto oxidado a aldeído (Fig. 14-13).

Na redução do NAD^+ (ou $NADP^+$), o íon hidreto poderia, em princípio, ser transferido para qualquer um dos lados do anel da nicotinamida: o lado anterior (A) ou o lado posterior (B), conforme representado na Figura 14-15. Estudos com substratos marcados isotopicamente demonstraram que as enzimas podem catalisar transferências do tipo A ou do tipo B, mas nunca ambas. Por exemplo, a álcool desidrogenase de levedura e a lactato desidrogenase de coração de vertebrados transferem um íon hidreto para o (ou removem um íon hidreto do) lado A do anel da nicotinamida, sendo, portanto, classificadas como desidrogenases do tipo A, distinguindo-se de um outro grupo de enzimas que transferem um íon hidreto para o (ou removem um íon hidreto do) lado B do anel da nicotinamida (Tabela 14-8).

Tabela 14-8 – Estereoespecificidade das desidrogenases que utilizam NAD⁺ ou NADP⁺ como coenzimas

Enzima	Coenzima	Especificidade estereoquímica para o anel da nicotinamida (A ou B)
Isocitrato desidrogenase	NAD⁺	A
α-Cetoglutarato desidrogenase	NAD⁺	B
Glicose-6-fosfato desidrogenase	NADP⁺	B
Malato desidrogenase	NAD⁺	A
Glutamato desidrogenase	NAD⁺ ou NADP⁺	B
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	NAD⁺	B
Lactato desidrogenase	NAD⁺	A
Álcool desidrogenase	NAD⁺	A

A interação entre desidrogenase e NAD ou NADP é relativamente fraca, de tal forma que a coenzima se difunde facilmente de uma enzima para outra, atuando como um transportador hidrossolúvel de elétrons de um metabólito para outro. Por exemplo, na produção de álcool por fermentação da glicose por células de levedura, um íon hidreto é removido do gliceraldeído-3-fosfato pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima do tipo B, e transferido para o NAD^+. O NADH assim formado abandona a superfície da enzima difundindo-se para a álcool desidrogenase, uma enzima do tipo A, que transfere o íon hidreto para o acetaldeído, produzindo etanol:

(1) Gliceraldeído-3-fosfato + $NAD^+ \longrightarrow$
3-fosfoglicerato + NADH + H^+
(2) Acetaldeído + NADH + $H^+ \longrightarrow$ etanol + NAD^+

Somatório: Gliceraldeído-3-fosfato + acetaldeído $\longrightarrow$
3-fosfoglicerato + etanol

Observe que na reação total não há produção ou consumo líquido de NAD^+ ou NADH; as coenzimas funcionam cataliticamente, sendo repetidamente recicladas sem que o somatório de suas concentrações (NAD^+ + NADH) sofra alteração.

Nucleotídeos de flavina são fortemente ligados a flavoproteínas

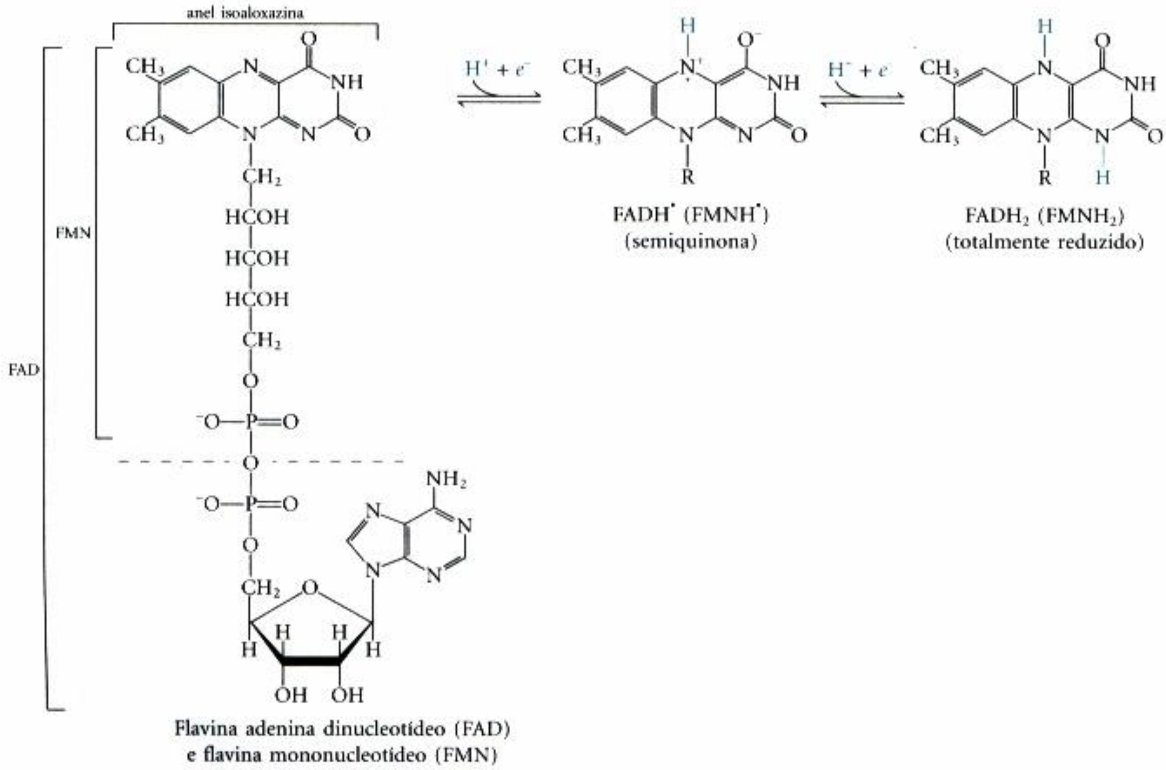
As flavoproteínas (Tabela 14-9) são enzimas que catalisam reações de oxidação-redução utilizando tanto flavina mononucleotídeo (FMN) quanto flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como coenzimas (Fig. 14-16). Essas coenzimas são derivadas da vitamina riboflavina. A estrutura em anel fundido dos nucleotídeos de flavina (o anel isoaloxazina) sofre redução reversível, incorporando a partir de um substrato reduzido um ou dois elétrons na forma de um ou dois átomos de hidrogênio (1 elétron + 1 próton). As formas totalmente reduzidas são representadas por $FADH_2$ e $FMNH_2$. Quando um nucleotídeo de flavina totalmente oxidado incorpora somente um elétron (um átomo de hidrogênio), a forma semiquinona do anel isoaloxazina ($FADH^{\bullet}$ e $FMNH^{\bullet}$) é produzida. Como as flavoproteínas podem participar da transferência tanto de um quanto de dois elétrons, a diversidade de reações nas quais essa classe de proteínas está envolvida é maior do que a das desidrogenases ligadas a nucleotídeos de piridina.

Tabela 14-9 – Algumas enzimas (flavoproteínas) que utilizam coenzimas flavina nucleotídeo

Enzima	Flavina nucleotídeo
Acil-CoA graxo desidrogenase	FAD
Diidrolipoil desidrogenase	FAD
Succinato desidrogenase	FAD
Glicerol-3-fosfato desidrogenase	FAD
Tioredoxina redutase	FAD
NADH desidrogenase (complexo I)	FMN
Glicolato desidrogenase	FMN

Assim como as coenzimas de nicotinamida (Fig. 14-15), a redução dos nucleotídeos de flavina é acompanhada por um deslocamento na sua principal faixa de absorção de luz. Assim, as flavoproteínas oxidadas geralmente apresentam um pico de absorção máxima em comprimentos de onda próximos a 570nm; quando reduzidas, esse pico é deslocado para aproximadamente 450nm. Essa característica pode ser útil no monitoramento de reações envolvendo uma flavoproteína.

Na maioria das flavoproteínas, o nucleotídeo de flavina encontra-se fortemente ligado à proteína e, em algumas enzimas como a succinato desidrogenase, a ligação é covalente. Essas coenzimas fortemente ligadas são apropriadamente denominadas grupos prostéticos. Elas não transferem elétrons difundindo-se de uma enzima para outra, mas sim favorecem a retenção temporária dos elétrons pelas flavoproteínas enquanto a transferência deles de um substrato reduzido para um receptor de elétrons é catalisada. Uma característica importante das flavoproteínas é a variabilidade no potencial de redução padrão (E'^{o}) do nucleotídeo de flavina ligado a elas. A forte interação entre a enzima e o grupo prostético confere ao anel de flavina potenciais de redução diferenciados em função de cada flavoproteína específica, algumas vezes muito diferentes do potencial de redução do nucleotídeo de flavina livre. O FAD ligado à succinato desidrogenase, por exemplo, possui E'^{o} próximo a 0,0V, enquanto o FAD livre possui E'^{o} igual a –0,219V. As flavoproteínas são, em geral, muito complexas; algumas possuem, além do nucleotídeo de flavina, íons inorgânicos fortemente ligados (ferro ou molibdênio, por exemplo) com uma participação efetiva na transferência dos elétrons.



Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN)

Figura 14-16 – Estruturas das formas oxidada e reduzida de FAD e FMN. Esta figura mostra a estrutura do FAD (oxidado), cuja parte superior à linha tracejada corresponde ao FMN. Os nucleotídeos de flavina recebem dois átomos de hidrogênio (dois elétrons e dois prótons); ambos aparecem no sistema em anel da flavina. Quando FAD e FMN recebem apenas um átomo de hidrogênio, forma-se a semiquinona, um radical livre estável.

Resumo

As células vivas constantemente realizam trabalho, necessitando de energia para a manutenção de estruturas altamente organizadas, síntese de componentes celulares, realização de movimento, geração de correntes elétricas e produção de luz, além de uma variedade de outros processos. Bioenergética é o estudo quantitativo da relação de energia e sua conversão nos sistemas biológicos. As transformações de energia biológica obedecem às leis da termodinâmica. Todas as reações químicas são influenciadas por duas forças: a tendência para atingir o estado de ligação mais estável (para o qual a entalpia, H, é a expressão pertinente) e a tendência para atingir o mais elevado grau de desordem, expresso como entropia, S. A força propulsora da reação é a variação de energia livre, ΔG, que resulta desses dois fatores: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$. As células necessitam de fontes de energia livre para realizar trabalho.

A variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$, é a constante física característica de uma determinada reação, podendo ser calculada a partir da constante de equilíbrio desta reação: $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$. A variação de energia livre real, ΔG, é uma variável dependente de $\Delta G'^{\circ}$, além das concentrações de reagentes e produtos: $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln$ ([produtos]/[reagentes]). Quando o valor de ΔG é alto e negativo, a reação tende a ocorrer no sentido direto; quando ele é alto e positivo, a reação tende a ocorrer no sentido inverso; quando $\Delta G = 0$, o sistema encontra-se em equilíbrio. A variação de energia livre para uma reação é independente da via pela qual ela ocorre. As variações de energia livre são aditivas. Assim, a reação química resultante de reações sucessivas que compartilham um intermediário comum apresenta variação de energia livre total correspondente ao somatório dos valores de ΔG das reações individuais.

O ATP estabelece a ligação química entre catabolismo e anabolismo, correspondendo à "moeda" de energia das células vivas. Sua conversão exergônica em ADP e P_i, ou em AMP e PP_i, está acoplada a um grande número de reações e processos endergônicos. Em geral, não é a hidrólise do ATP, mas sim a transferência de um grupo fosforil, pirofosforil ou adenilil do ATP para uma molécula de substrato ou enzima que acopla a energia da quebra do ATP a transformações endergônicas de substratos. Por meio dessas reações de transferência de grupo, o ATP fornece energia para as reações anabólicas, incluindo a síntese de moléculas informacionais, e para o transporte de moléculas e íons através de membranas, contra gradientes de concentração e de potencial elétrico. A contração muscular é uma das muitas exceções a essa generalização; as alterações conformacionais que produzem a contração muscular são induzidas diretamente pela hidrólise do ATP.

As células possuem outros metabólitos com energia livre de hidrólise elevada e negativa, incluindo fosfoenolpiruvato, 1,3-difosfoglicerato e fosfocreatina. Esses compostos de alta energia, como o ATP, possuem um alto potencial de transferência de grupos fosforil, ou seja, eles são bons doadores de grupos fosforil. Os tioésteres também apresentam alta energia livre de hidrólise.

As reações de oxidação-redução biológicas podem ser descritas em termos de duas meias-reações, cada uma delas com um potencial de redução característico, E'°. Quando duas meias-células eletroquímicas, cada uma contendo os componentes de uma meia-reação, são conectadas, os elétrons tendem a fluir para a meia-célula com o maior potencial de redução. Essa tendência é proporcional à diferença entre os dois potenciais de redução (ΔE), uma função das concentrações das espécies oxidadas e reduzidas. A variação de energia livre padrão para uma reação de oxidação-redução é diretamente proporcional à diferença nos potenciais de redução-padrão das duas meias-células: $\Delta G'^{\circ} = -n\mathcal{F}\,\Delta E'^{\circ}$.

Muitas reações de oxidação biológica são desidrogenações nas quais um ou dois átomos de hidrogênio (elétron + próton) são transferidos de um substrato para um receptor de hidrogênio. Reações de oxidação-redução nas células envolvem transportadores de elétrons especializados. NAD e NADP são as coenzimas livremente difusíveis de muitas desidrogenases. Tanto NAD^+ como $NADP^+$ recebem dois elétrons e um próton. Os nucleotídeos de flavina, FAD e FMN, atuam como grupos prostéticos fortemente ligados das flavoproteínas; eles podem receber um ou dois elétrons. Em muitos organismos, o processo central de conservação de energia é a oxidação gradual da glicose a CO_2. Parte da energia da oxidação é conservada na forma de ATP à medida que elétrons são transferidos ao O_2.

Leitura Adicional

Bioenergética e termodinâmica

Atkins PW. (1984) *The Second Law*, Scientific American Books, Inc., New York.

Uma discussão elementar e bem ilustrada da segunda lei e suas implicações.

Becker WM. (1977) *Energy and the Living Cell: An Introduction to Bioenergetics*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia.

Uma clara consideração introdutória do metabolismo celular, em termos energéticos.

Bergethon PR. (1998) *The Physical Basis of Biochemistry*, Springer Verlag, New York.

Os capítulos 11 a 13 desse livro e os livros de Tinoco *et al.* e van Holde *et al.* (abaixo) são excelentes referências gerais para bioquímica física, apresentando uma boa análise das aplicações da termodinâmica à bioquímica.

Edsall JT & Gutfreund H. (1983) *Biothermodynamics: The Study of Biochemical Processes at Equilibrium*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Harold FM. (1986) *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma bela e clara discussão sobre a termodinâmica nos processos biológicos.

Harris DA. (1995) *Bioenergetics at a Glance*, Blackwell Science, Oxford.

Uma consideração sobre energética celular, curta e claramente escrita, incluindo capítulos introdutórios sobre termodinâmica.

Morowitz HJ. (1978) *Foundations of Bioenergetics*, Academic Press, Inc., New York.

Uma clara e rigorosa descrição da termodinâmica na biologia. (fora de impressão)

Tinoco I Jr, Sauer K, & Wang JC. (1996) *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences*, 3rd edn, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, N.J.

Os capítulos 2 a 5 envolvem termodinâmica.

Van Holde KE, Johnson WC, & Ho PS. (1998) *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.

Os capítulos 2 e 3 são especialmente relevantes.

Transferência de grupos fosforil e ATP

Alberty RA. (1994) Biochemical thermodynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 1-11.

Explica a distinção entre equações bioquímicas e químicas, além do cálculo e significado das propriedades termodinâmicas transformadas para o ATP e outros compostos fosforilados.

Bridger WA & Henderson JF. (1983) *Cell ATP*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

A química do ATP, além de suas funções catabólica, anabólica e regulatória.

Frey PA & Arabshahi A. (1995) Standard free-energy change for the hydrolysis of the α-β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* **34**, 11.307-11.310.

Hanson RW. (1989) The role of ATP in metabolism. *Biochem. Educ.* **17**, 86-92.

Excelente resumo da química e biologia do ATP.

Lipmann F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol.* **11**, 99-162.

A descrição clássica da função dos compostos fosfato de alta energia em biologia.

Pullman B & Pullman A. (1960) Electronic structure of energy-rich phosphates. *Radiat. Res.* Suppl. 2, pp. 160-181.

Uma discussão avançada da química do ATP e de outros compostos "ricos em energia".

Veech RL, Lawson JWR, Cornell NW, & Krebs HA. (1979) Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.* **254**, 6538-6547.

Determinação experimental das concentrações de ATP, ADP e P_i no cérebro, músculo e fígado, além de discussão sobre as dificuldades para determinação das variações de energia livre reais para a síntese do ATP nas células.

Westheimer FH. (1987) Why nature chose phosphates. *Science* **235**, 1173-1178.

A descrição de um químico sobre a particular adaptação dos ésteres e anidridos de fosfato para as transformações metabólicas.

Reações biológicas de oxidação-redução

Dolphin D, Avramovic O, & Poulson R (eds). (1987) *Pyridine Nucleotide Coenzymes: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Uma excelente coleção em dois volumes de uma revisão autorizada. Entre os mais úteis estão os capítulos de Kaplan, Westheimer, Veech e Ohno e Ushio.

Problemas

1. Variações na entropia durante o desenvolvimento do ovo. Considere um sistema compreendido por um ovo em uma incubadora. A gema e a clara do ovo contêm proteínas, carboidratos e lipídios. Uma vez fertilizado, o ovo evolui de uma única célula para um organismo complexo. Aborde esse processo irreversível em termos de variações na entropia em relação ao sistema, ao ambiente e ao universo. (É necessária uma definição clara dos conceitos de sistema e ambiente.)

2. Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$ a partir das constantes de equilíbrio. Calcule as variações de energia livre padrão para as seguintes reações metabolicamente importantes, catalisadas por enzimas a 25°C, pH 7,0, a partir de suas constantes de equilíbrio:

(a) $\text{Glutamato} + \text{oxaloacetato} \xrightleftharpoons{\text{aspartato aminotransferase}} \text{aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato} \quad K'_{eq} = 6{,}8$

(b) $\text{Diidroxiacetona fosfato} \xrightleftharpoons{\text{triose fosfato isomerase}} \text{gliceraldeído 3-fosfato} \quad K'_{eq} = 0{,}0475$

(c) $\text{Frutose-6-fosfato} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{fosfofrutoquinase}} \text{frutose-1,6-difosfato} + \text{ADP} \quad K'_{eq} = 254$

3. Cálculo das constantes de equilíbrio a partir de $\Delta G'^{\circ}$. Calcule as constantes de equilíbrio, K'_{eq}, para cada uma das seguintes reações em pH 7,0, a 25°C, utilizando os valores de $\Delta G'^{\circ}$ apresentados na Tabela 14-4:

(a) $\text{Glicose-6-fosfato} + H_2O \xrightleftharpoons{\text{glicose-6-fosfatase}} \text{glicose} + P_i$

(b) $\text{Lactose} + H_2O \xrightleftharpoons{\beta\text{-galactosidase}} \text{glicose} + \text{galactose}$

(c) $\text{Malato} \xrightleftharpoons{\text{fumarase}} \text{fumarato} + H_2O$

4. Determinação experimental da K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$. Se uma solução de glicose-1-fosfato 0,1M é incubada com uma quantidade catalítica de fosfoglicomutase, a glicose-1-fosfato é transformada em glicose-6-fosfato. No estado de equilíbrio, as concentrações dos componentes da reação são as seguintes:

$$\underset{4{,}5 \times 10^{-3}\text{M}}{\text{Glicose-1-fosfato}} \rightleftharpoons \underset{9{,}6 \times 10^{-2}\text{M}}{\text{glicose-6-fosfato}}$$

Calcule a K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$ para esta reação a 25°C.

5. Determinação experimental de $\Delta G'^{\circ}$ para a hidrólise do ATP. A determinação direta da variação de energia livre padrão associada à hidrólise do ATP é dificultada devido à ínfima quantidade de ATP remanescente no estado de equilíbrio. Entretanto, o valor de $\Delta G'^{\circ}$ pode ser calculado indiretamente a partir das constantes de equilíbrio, menos favoráveis, de duas outras reações enzimáticas:

$\text{Glicose-6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glicose} + P_i \quad K'_{eq} = 270$

$\text{ATP} + \text{glicose} \longrightarrow \text{ADP} + \text{glicose-6-fosfato} \quad K'_{eq} = 890$

A partir dessas informações, calcule a energia livre padrão de hidrólise do ATP a 25°C.

6. Diferença entre $\Delta G'^{\circ}$ e ΔG. Considere a seguinte interconversão que ocorre na glicólise (Capítulo 15):

$$\text{Frutose-6-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose-6-fosfato} \qquad K'_{eq} = 1{,}97$$

(a) Qual é o valor de $\Delta G'^{\circ}$ para a reação, assumindo-se que a temperatura é 25°C?

(b) Se a concentração de frutose-6-fosfato for ajustada para 1,5M e a de glicose-6-fosfato para 0,5M, qual será o valor de ΔG?

(c) Por que $\Delta G'^{\circ}$ e ΔG são diferentes?

7. Dependência de ΔG em relação ao pH. Sob condições-padrão, em pH 7,0, a energia livre liberada pela hidrólise do ATP é –30,5kJ/mol. Se o ATP for hidrolisado sob condições-padrão, porém em pH 5,0, haverá maior ou menor liberação de energia livre? Por quê?

8. O valor de $\Delta G'^{\circ}$ para reações acopladas. A glicose-1-fosfato é convertida em frutose-6-fosfato por meio de duas reações sucessivas:

$$\text{Glicose-1-fosfato} \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato}$$
$$\text{Glicose-6-fosfato} \longrightarrow \text{frutose-6-fosfato}$$

Usando os valores de $\Delta G'^{\circ}$ apresentados na Tabela 14-4, calcule a constante de equilíbrio, K'_{eq}, para o somatório das duas reações, a 25°C:

$$\text{Glicose-1-fosfato} \longrightarrow \text{frutose-6-fosfato}$$

9. Estratégia para contornar uma reação desfavorável: acoplamento químico dependente de ATP. A fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato é a etapa inicial do catabolismo da glicose. A fosforilação direta da glicose por P_i é descrita pela equação

$$\text{Glicose} + P_i \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G'^{\circ} = 13{,}8\text{kJ/mol}$$

(a) Calcule a constante de equilíbrio para a reação acima. Em hepatócito de rato, as concentrações fisiológicas de glicose e P_i são mantidas em aproximadamente 4,8mM. Qual é a concentração de equilíbrio da glicose-6-fosfato obtida por meio de fosforilação direta da glicose por P_i? Seria esta reação uma via metabólica razoável para o catabolismo da glicose? Explique.

(b) Ao menos em princípio, uma forma de aumentar a concentração de glicose-6-fosfato consiste em deslocar o equilíbrio da reação para a direita, por meio de aumento nas concentrações intracelulares de glicose e P_i. Supondo-se uma concentração de P_i igual a 4,8mM, a que valor deve ser aumentada a concentração de glicose intracelular para obter-se uma concentração de equilíbrio da glicose-6-fosfato igual a 250μM (concentração fisiológica normal)? Sabendo-se que a solubilidade máxima da glicose é inferior a 1M, seria essa tentativa fisiologicamente razoável?

(c) A fosforilação da glicose na célula é acoplada à hidrólise do ATP, isto é, parte da energia livre de hidrólise do ATP é utilizada na fosforilação endergônica da glicose:

$$\text{(1) Glicose} + P_i \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G'^{\circ} = 13{,}8\text{kJ/mol}$$
$$\text{(2) ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -30{,}5\text{kJ/mol}$$
$$\textit{Somatório}\text{: Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

Calcule a K'_{eq} para a reação total. Para a fosforilação da glicose dependente de ATP, qual é a concentração de glicose necessária para obter-se uma concentração intracelular de glicose-6-fosfato igual a 250μM, supondo-se que as concentrações de ATP e ADP são iguais a 3,38 e 1,32mM, respectivamente? Esse processo de acoplamento representa, ao menos em princípio, uma via factível para a fosforilação da glicose nas condições em que ela ocorre na célula? Explique.

(d) Embora o acoplamento da hidrólise do ATP à fosforilação da glicose seja termodinamicamente viável, a forma como ele ocorre ainda não é conhecida. Desde que o acoplamento requer um intermediário comum, uma via concebível seria a utilização da hidrólise do ATP para aumentar a concentração intracelular de P_i, promovendo, assim, a fosforilação desfavorável da glicose por P_i. Seria essa uma via razoável? (Leve em consideração os produtos de solubilidade dos intermediários metabólicos.)

(e) A fosforilação da glicose acoplada ao ATP no hepatócito é catalisada pela glicoquinase. A enzima liga ATP e glicose, formando um complexo glicose-ATP-enzima, e o grupo fosforil é transferido diretamente do ATP para a glicose. Explique as vantagens dessa via.

10. Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$ para reações acopladas ao ATP. A partir dos dados da Tabela 14-6, calcule o valor de $\Delta G'^{\circ}$ para as reações:

(a) Fosfocreatina + ADP ⟶ creatina + ATP

(b) ATP + frutose ⟶ ADP + frutose-6-fosfato

11. Acoplamento da hidrólise do ATP a uma reação desfavorável. Para avaliar as conseqüências do acoplamento da hidrólise do ATP a uma reação bioquímica termodinamicamente desfavorável, sob condições fisiológicas, considere a transformação hipotética X → Y, para a qual $\Delta G'^{\circ} = 20\text{kJ/mol}$.

(a) Qual é o valor de [Y]/[X] no estado de equilíbrio?

(b) Considere que X e Y participam de uma seqüência de reações que inclui a hidrólise do ATP a ADP e P_i. A reação total é

$$X + \text{ATP} + H_2O \longrightarrow Y + \text{ADP} + P_i$$

Calcule [Y]/[X] para a reação no estado de equilíbrio, assumindo que as concentrações de ATP, ADP e P_i são todas iguais a 1M quando a reação se encontra no estado de equilíbrio.

(c) Sabe-se que em condições fisiológicas as concentrações de [ATP], [ADP] e [P_i] *não* são iguais a 1M. Assim, calcule [Y]/[X] para a reação acoplada quando as concentrações de [ATP], [ADP] e [P_i] forem iguais às encontradas em miócito de rato (Tabela 14-5).

12. Cálculo de ΔG em concentrações fisiológicas. Calcule o valor fisiológico de ΔG (não $\Delta G'^{\circ}$) para a reação

Fosfocreatina + ADP ⟶ creatina + ATP

a 25°C, na forma como ela ocorre no citosol dos neurônios, no qual as concentrações de fosfocreatina, creatina, ADP e ATP são 4,7mM, 1,0mM, 0,73mM e 2,6mM, respectivamente.

13. Energia livre necessária para síntese de ATP sob condições fisiológicas. No citosol de hepatócito de rato, pode-se observar a seguinte razão:

$$\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][P_i]} = 5{,}33 \times 10^2\,\text{M}^{-1}$$

Calcule a energia livre necessária para sintetizar ATP nessas condições.

14. Utilização diária de ATP por indivíduos adultos.

(a) Um total de 30,5kJ/mol de energia livre é necessário para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i quando reagentes e produtos estão presentes em concentrações iguais a 1M (condição-padrão). Como as concentrações fisiológicas dessas substâncias nas células não são iguais a 1M, a energia livre necessária para sintetizar ATP sob condições fisiológicas é diferente de $\Delta G'^{\circ}$. Calcule a energia livre necessária para a síntese do ATP em hepatócito humano, em que as concentrações fisiológicas de ATP, ADP e P_i são 3,5mM, 1,50mM e 5,0mM, respectivamente.

(b) Um adulto normal de 68kg (150lb) precisa ingerir alimentos que lhe forneçam 2.000kcal (8.360kJ) durante um período de 24 horas. Esses alimentos são metabolizados, e a energia livre é utilizada para sintetizar

ATP para a realização de trabalho químico e mecânico. Assumindo que a eficiência da conversão da energia dos alimentos em ATP é de 50%, calcule a massa de ATP necessária a um indivíduo adulto durante um período de 24 horas. Que porcentagem da massa corporal esse valor representa?

(c) Embora indivíduos adultos sintetizem diariamente grandes quantidades de ATP, a sua massa corporal, estrutura e composição não variam significativamente durante o mesmo período. Explique essa aparente contradição.

15. Taxas de reciclagem dos fosfatos γ e β do ATP. Se uma pequena quantidade de ATP marcado com fósforo radioativo na posição terminal [γ-^{32}P]ATP é adicionada a um extrato de levedura, aproximadamente metade da radioatividade do ^{32}P é encontrada no P_i após alguns poucos minutos, mas a concentração de ATP mantém-se inalterada. Explique. Se o mesmo experimento é realizado com o ATP marcado com ^{32}P na posição central, [β-^{32}P]ATP, isso não ocorre, ao menos dentro de um curto período. Por quê?

16. Quebra do ATP em AMP e PP_i durante o metabolismo. A síntese da forma ativada do acetato, a acetil-CoA, é um processo dependente de ATP:

$$\text{Acetato} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acetil-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

(a) O valor de $\Delta G'^{\circ}$ para a hidrólise de acetil-CoA em acetato e CoA é −32,2kJ/mol e para a hidrólise do ATP em AMP, e PP_i é −30,5kJ/mol. Calcule o valor de $\Delta G'^{\circ}$ para a síntese de acetil-CoA dependente de ATP.

(b) Quase todas as células contêm a enzima pirofosfatase inorgânica, que catalisa a hidrólise do PP_i em P_i. Qual é o efeito dessa enzima sobre a síntese de acetil-CoA? Explique.

17. Energia para o bombeamento de H^+. As células parietais de revestimento do estômago contêm "bombas" de membrana que transportam íons hidrogênio do citosol dessas células (pH 7,0) para o estômago, contribuindo com a acidez do suco gástrico (pH 1,0). Calcule a energia livre necessária para transportar 1 mol de íon hidrogênio por meio dessas "bombas". (Sugestão: veja Capítulo 13.) Considere a temperatura como sendo 25°C.

18. Potenciais de redução padrão. O potencial de redução padrão, E'°, de qualquer par redox é definido para a reação da meia-célula:

$$\text{Agente oxidante} + n \text{ elétrons} \longrightarrow \text{agente redutor}$$

Os valores de E'° para os pares redox conjugados NAD^+/NADH e piruvato/lactato são iguais a −0,32 e −0,19V, respectivamente.

(a) Qual desses pares conjugados apresenta a maior tendência em perder elétrons? Explique.

(b) Qual é o agente oxidante mais forte? Explique.

(c) Iniciando-se com reagentes e produtos em concentrações iguais a 1M e em pH 7,0, em qual sentido irá ocorrer a seguinte reação?

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + NAD^+$$

(d) Qual é a variação de energia livre padrão ($\Delta G'^{\circ}$), a 25°C, para a conversão do piruvato em lactato?

(e) Qual é a constante de equilíbrio (K'_{eq}) desta reação?

19. Extensão da energia na cadeia respiratória. Pode-se representar a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial como se segue:

$$\text{NADH} + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

(a) Calcule $\Delta E'^{\circ}$ para a reação líquida de transferência de elétrons pelas mitocôndrias.

(b) Calcule $\Delta G'^{\circ}$ para a mesma reação.

(c) Quantas moléculas de ATP podem, *teoricamente*, ser geradas por esta reação, considerando-se que a energia livre para síntese de ATP nas condições celulares padrão é 52kJ/mol?

20. Dependência da força eletromotiva com relação às concentrações. Calcule a força eletromotiva (em volts) registrada por um elétrodo mergulhado em uma solução contendo as seguintes misturas de NAD^+ e NADH, em pH 7,0, a 25°C, com referência a uma meia-célula de E'° = 0,00V.

(a) 1,0mM NAD^+ e 10mM NADH

(b) 1,0mM NAD^+ e 1,0mM NADH

(c) 10mM NAD^+ e 1,0mM NADH

21. Afinidade dos compostos por elétrons. Faça uma relação das seguintes substâncias, em ordem crescente de tendência em receber elétrons: (a) α-cetoglutarato + CO_2 (liberando isocitrato); (b) oxaloacetato; (c) O_2; (d) $NADP^+$.

22. Sentido das reações de oxidação-redução. Das reações a seguir, quais se espera que possam ocorrer no sentido apresentado, sob condições-padrão, assumindo-se a presença das enzimas apropriadas para catalisá-las?

(a) Malato + NAD^+ ⟶ oxaloacetato + NADH + H^+

(b) Acetoacetato + NADH + H^+ ⟶
β-hidroxibutirato + NAD^+

(c) Piruvato + NADH + H^+ ⟶ lactato + NAD^+

(d) Piruvato + β-hidroxibutirato ⟶
lactato + acetoacetato

(e) Malato + piruvato ⟶ oxaloacetato + lactato

(f) Acetaldeído + succinato ⟶ etanol + fumarato

CAPÍTULO 15

A Glicólise e o Catabolismo das Hexoses

A D-glicose é o principal combustível da maioria dos organismos e ocupa uma posição central no metabolismo. Ela é relativamente rica em energia potencial; a sua oxidação completa até dióxido de carbono e água ocorre com uma variação da energia livre padrão de −2.840kJ/mol. Por meio do armazenamento da glicose como um polímero de massa molecular alta, a célula pode acumular grandes quantidades de unidades de hexose, enquanto mantém uma osmolaridade citosólica relativamente baixa. Quando as demandas energéticas aumentam subitamente, a glicose pode ser liberada rapidamente desses polímeros de armazenamento intracelulares e ser empregada para produzir ATP de maneira aeróbica ou anaeróbica.

A glicose não é apenas um excelente combustível, é também um precursor admiravelmente versátil, capaz de suprir uma vasta gama de intermediários metabólicos que são os materiais primários necessários para as reações biossintéticas. A partir da glicose, a *Escherichia coli* pode obter os esqueletos carbônicos para cada um dos seus aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas, ácidos graxos e outros intermediários metabólicos necessários para o seu crescimento e multiplicação. Um estudo completo dos numerosos destinos metabólicos da glicose abrangeria centenas, ou mesmo milhares, de transformações químicas. Nos vegetais superiores e nos animais, a glicose tem três destinos principais: pode ser armazenada (como um polissacarídeo ou como sacarose), ser oxidada a compostos de três átomos de carbono (piruvato), por meio da glicólise, ou ser oxidada a pentoses, por meio das pentoses fosfato (fosfogliconato) (Fig. 15-1).

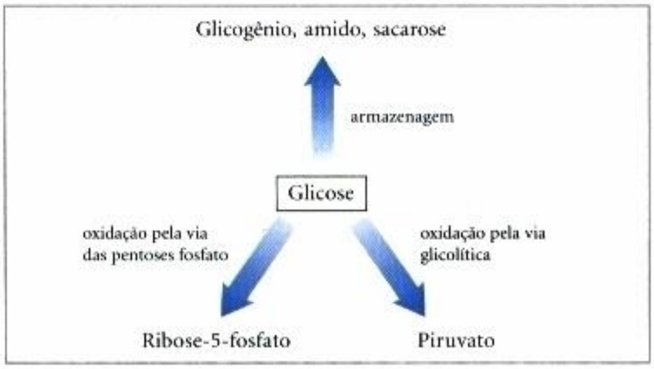

Glicogênio, amido, sacarose
armazenagem
Glicose
oxidação pela via das pentoses fosfato
oxidação pela via glicolítica
Ribose-5-fosfato
Piruvato

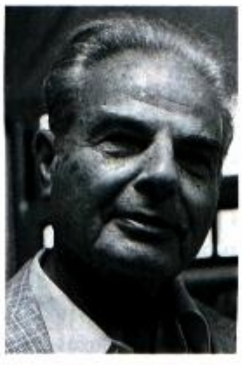
Figura 15-1 – As vias principais de utilização da glicose nas células dos vegetais superiores e dos animais. Embora não sejam os únicos destinos possíveis da glicose, essas três vias são, na maioria das células, as mais significativas em termos da quantidade de glicose que flui através delas.

Este capítulo começa com a descrição das reações individuais que constituem a via glicolítica e das enzimas que as catalisam. Logo após, consideraremos a fermentação da glicose, ou seja, a operação da via glicolítica em condições anaeróbicas. As fontes de unidades de glicose para a glicólise são muitas e diferentes, e a seguir descreveremos as vias que trazem átomos de carbono para a glicólise, a partir de hexoses outras que não a glicose e a partir de dissacarídeos e polissacarídeos. Como todas as vias metabólicas, a glicólise está sob rígida regulação. Discutiremos os princípios gerais da regulação metabólica e, então, ilustraremos esses princípios com a via glicolítica. Este capítulo conclui com uma breve descrição de duas outras vias catabólicas que se iniciam com a glicose: uma levando às pentoses.

Glicólise

Na **glicólise** (do grego *glykys*, que significa "doce", e *lysis*, que significa "quebra"), uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas do composto piruvato, contendo cada uma delas três átomos de carbono. Durante as reações seqüenciais da glicólise, parte da energia livre liberada da glicose é conservada na forma de ATP e de NADH. A glicólise foi a primeira via metabólica a ser elucidada e é provável que, atualmente, seja a mais bem entendida. Desde a descoberta de Eduard Büchner (em 1897) da fermentação que ocorre em extratos de células rompidas de levedura até o reconhecimento claro por Fritz Lipmann e Herman Kalckar (em 1941) do papel metabólico dos compostos de alta energia como o ATP, as reações da glicólise em extratos de levedura e de músculo foram o centro da pesquisa bioquímica. O desenvolvimento dos métodos de purificação de enzimas, a descoberta e o reconhecimento da importância de coenzimas como o NAD e a descoberta do papel metabólico polivalente do ATP e de outros compostos fosforilados vieram, todos, de estudos sobre a glicólise. Atualmente, as enzimas da glicólise de muitos organismos já foram cuidadosamente purificadas e estudadas.

Fritz Lipmann
(1899-1986)



Herman Kalckar
(1908-1991)

A glicólise é uma via central quase universal do catabolismo da glicose. É a via através da qual, na maioria das células, ocorre o maior fluxo de carbono. Em certos tecidos e tipos celulares de mamíferos (eritrócitos, medula renal, cérebro e esperma, por exemplo), a glicose, por meio da glicólise, é a única fonte de energia metabólica. Alguns tecidos vegetais que são modificados para o armazenamento de amido, como os tubérculos da batata, e alguns vegetais adaptados para crescer em áreas regularmente inundadas pela água (agrião, por exemplo) derivam a maior parte de sua energia da glicólise; muitos tipos de microrganismos anaeróbicos são inteiramente dependentes da glicólise.

Fermentação é um termo geral que denota a degradação *anaeróbica* da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos (característicos para os diferentes organismos) para obter energia conservada na forma de ATP. A quebra anaeróbica da glicose é, provavelmente, o mais antigo mecanismo biológico para obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis, já que os organismos vivos apareceram primeiro em uma atmosfera destituída de oxigênio. No curso da evolução, essa seqüência de reações foi completamente conservada; as enzimas glicolíticas dos animais vertebrados são muito semelhantes na seqüência de aminoácidos e na estrutura tridimensional às enzimas homólogas na levedura e no espinafre. O processo da glicólise difere de uma espécie para outra apenas em detalhes da sua regulação e no destino metabólico subseqüente do piruvato formado. Os princípios termodinâmicos e os tipos de mecanismos reguladores na glicólise são encontrados em todas as vias do metabolismo celular. Um estudo da glicólise pode servir como modelo para muitos aspectos das vias que serão discutidas neste livro.

Antes de estudarmos cada passo da via em detalhe, vamos examinar a glicólise como um todo.

Uma visão geral: a glicólise possui duas fases

A glicose tem seis átomos de carbono e sua divisão em duas moléculas de piruvato, cada uma com três átomos de carbono, ocorre em uma seqüência de 10 passos, os cinco primeiros constituem a *fase preparatória* (Fig. 15-2a). Nessas reações, a glicose é inicialmente fosforilada no grupo hidroxila em C-6 (passo ①). A D-glicose-6-fosfato assim formada é convertida em D-frutose-6-fosfato (passo ②), a qual é novamente fosforilada, dessa vez em C-1, para liberar D-frutose-1,6-bifosfato (passo ③). O ATP é o doador de fosfato nas duas fosforilações. Como todos os derivados dos açúcares que ocorrem na via glicolítica são os isômeros D, omitiremos a designação D, exceto quando desejarmos enfatizar sua estereoquímica.

A seguir, a frutose-1,6-bifosfato é quebrada para liberar duas moléculas com três carbonos, a diidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato (passo ④); esse é o passo em que ocorre a "lysis" que dá o nome ao processo. A diidroxiacetona fosfato é isomerizada em uma segunda molécula de gliceraldeído-3-fosfato (passo ⑤), e com isso termina a primeira fase da glicólise. Note que duas moléculas de ATP precisam ser investidas para ativar, ou iniciar, a molécula de glicose para a sua quebra em duas partes com três carbonos; haverá, depois, um retorno positivo para esse investimento. Resumindo: na fase preparatória da glicólise, a energia do ATP é investida, aumentando o conteúdo de energia livre dos intermediários, e as cadeias carbônicas de todas as hexoses metabolizadas são convertidas em um produto comum, o gliceraldeído-3-fosfato.

O ganho energético provém da *fase de pagamento* da glicólise (Fig. 15-2b). Cada molécula de gliceraldeído-3-fosfato é oxidada e fosforilada por fosfato inorgânico (*não* pelo ATP) para formar 1,3-bifosfoglicerato (passo ⑥). A liberação de energia ocorre quando as duas moléculas de 1,3-bifosfoglicerato são convertidas em duas moléculas de piruvato (passos ⑦ a ⑩). A maior parte dessa energia é conservada pela fosforilação acoplada de quatro moléculas de ADP para ATP. O produto líquido são duas moléculas de ATP por molécula de glicose empregada, uma vez que duas moléculas de ATP foram investidas na fase preparatória da glicólise. A energia também é conservada na fase de pagamento na formação de duas moléculas de NADH por molécula de glicose.

Nas reações seqüenciais da glicólise, três tipos de transformações químicas são particularmente notáveis: (1) rompimento do esqueleto carbônico da glicose para produzir piruvato; (2) fosforilação de ADP para ATP pelos compostos de fosfato de alta energia formados durante a glicólise, e (3) a transferência de um íon hidreto com seus elétrons para o NAD^+, formando NADH. O destino do produto, o piruvato, depende do tipo de célula e das circunstâncias metabólicas.

Destinos do piruvato. À exceção de interessantes variações encontradas entre as bactérias, o piruvato formado pela glicólise pode tomar três rotas catabólicas alternativas. Nos organismos aeróbicos, ou tecidos sob condições aeróbicas, a glicólise constitui apenas o primeiro estágio da degradação completa da glicose (Fig. 15-3). O piruvato é oxidado, com perda do seu grupo carboxila como CO_2, para liberar o grupo acetila da acetil-coenzima A, a qual é então totalmente oxidada a CO_2 pelo ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16). Os elétrons originados dessas oxidações são passados para o O_2 por meio de uma cadeia de transportadores na mitocôndria, formando H_2O. A energia liberada nas reações de transferência de elétrons permite a síntese de ATP nas mitocôndrias (Capítulo 19).

A segunda rota para o metabolismo do piruvato é a sua redução a lactato através da chamada via da **fermentação do ácido láctico.** Quando o tecido muscular esquelético em contração vigorosa funciona em condições de **hipóxia** — baixa pressão parcial de oxigênio —, o NADH não pode ser reoxidado a NAD^+, e este é necessário como receptor de elétrons para que o piruvato continue a ser oxidado. Nessas condições, o piruvato é reduzido a lactato por recepção dos elétrons do NADH e conseqüente regeneração do NAD^+ necessário para que o fluxo glicolítico prossiga. Certos tipos de tecidos e de células (retina, cérebro, eritrócitos) convertem a glicose em lactato, mesmo sob condições aeróbicas. O lactato (a forma dissociada do ácido láctico) é também o produto da glicólise sob condições anaeróbicas em alguns microrganismos (Fig. 15-3).

A terceira grande rota do metabolismo do piruvato leva ao etanol. Em alguns tecidos vegetais e em certos invertebrados, protistas e microrganismos como a levedura da fabricação da cerveja, o piruvato é convertido anaerobicamente em etanol e CO_2, um processo chamado de **fermentação alcoólica, fermentação do etanol** ou, simplesmente, **fermentação do álcool** (Fig. 15-3).

Embora o interesse principal deste capítulo seja o catabolismo, não podemos deixar de lembrar que o piruvato tem outros destinos, embora anabólicos. Ele pode, por exemplo, fornecer o esqueleto carbônico para síntese do aminoácido alanina. Voltaremos a essas reações anabólicas do piruvato em capítulos posteriores.

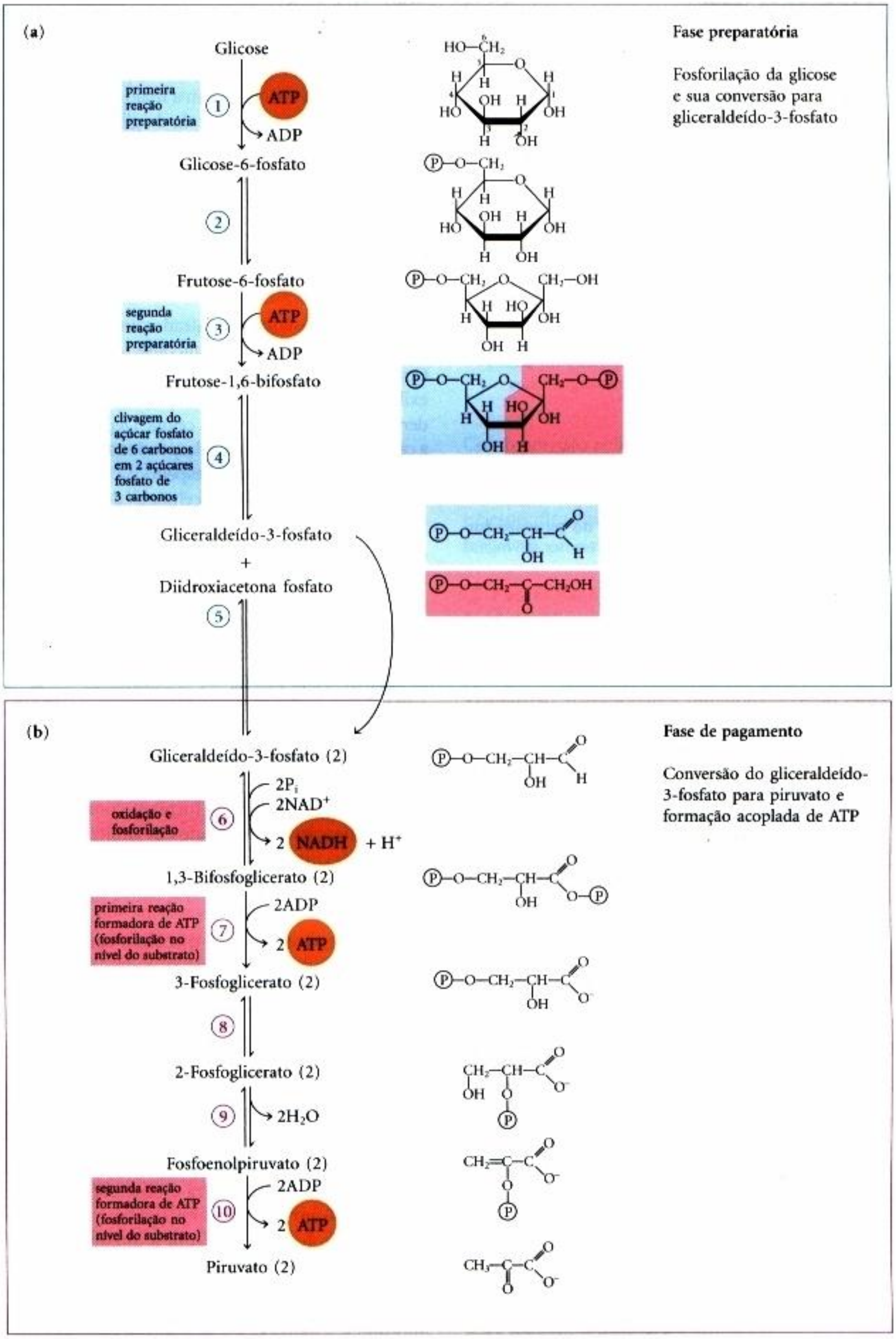

(a)
Glicose
primeira reação preparatória
①
ATP
ADP
Glicose-6-fosfato
②
Frutose-6-fosfato
segunda reação preparatória
③
ATP
ADP
Frutose-1,6-bifosfato
clivagem do açúcar fosfato de 6 carbonos em 2 açúcares fosfato de 3 carbonos
④
Gliceraldeído-3-fosfato
+
Diidroxiacetona fosfato
⑤
Fase preparatória
Fosforilação da glicose e sua conversão para gliceraldeído-3-fosfato
(b)
Gliceraldeído-3-fosfato (2)
2Pi
2NAD+
2 NADH + H+
oxidação e fosforilação
⑥
1,3-Bifosfoglicerato (2)
primeira reação formadora de ATP (fosforilação no nível do substrato)
⑦
2ADP
2 ATP
3-Fosfoglicerato (2)
⑧
2-Fosfoglicerato (2)
⑨
2H2O
Fosfoenolpiruvato (2)
segunda reação formadora de ATP (fosforilação no nível do substrato)
⑩
2ADP
2 ATP
Piruvato (2)
Fase de pagamento
Conversão do gliceraldeído-3-fosfato para piruvato e formação acoplada de ATP

Figura 15-2 – As duas fases da glicólise. Para cada molécula de glicose que passa pela fase preparatória (**a**), são formadas duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato e ambas passam pela fase de pagamento (**b**). O piruvato é o produto final da segunda fase. Para cada molécula de glicose metabolizada são consumidas duas moléculas de ATP na fase preparatória e quatro dessas moléculas são produzidas na fase de pagamento, dando um resultado líquido de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose convertida em piruvato. O número ao lado de cada passo de reação corresponde à numeração dada na discussão apresentada no texto. Lembre-se de que cada grupo fosfato, representado aqui como Ⓟ, tem duas cargas negativas ($—PO_3^{2-}$).

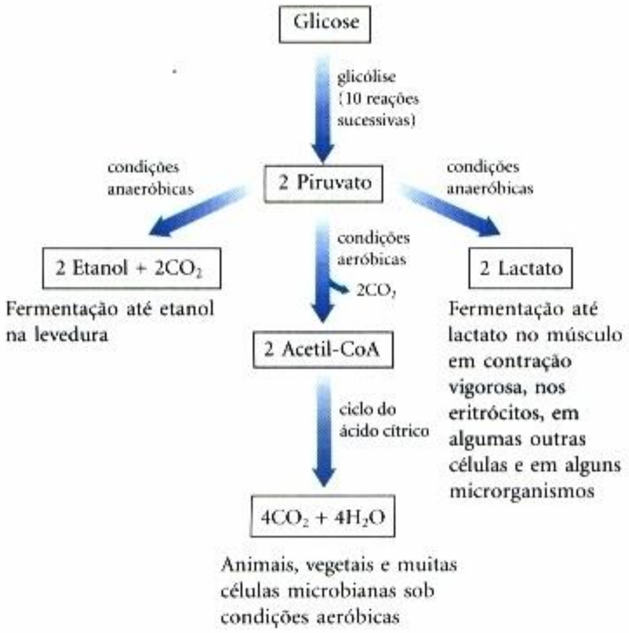

Glicose
glicólise (10 reações sucessivas)
condições anaeróbicas
2 Piruvato
condições anaeróbicas
condições aeróbicas
2 Etanol + 2CO$_2$
2CO$_2$
2 Lactato
Fermentação até etanol na levedura
2 Acetil-CoA
Fermentação até lactato no músculo em contração vigorosa, nos eritrócitos, em algumas outras células e em alguns microrganismos
ciclo do ácido cítrico
4CO$_2$ + 4H$_2$O
Animais, vegetais e muitas células microbianas sob condições aeróbicas

Figura 15-3 – Três possíveis destinos catabólicos do piruvato formado na glicólise. O piruvato também serve como precursor em muitas reações anabólicas que não estão mostradas aqui.

A formação de ATP acoplada à glicólise. Durante a glicólise parte da energia existente na molécula da glicose é conservada nas moléculas de ATP, enquanto a maior parte permanece nas moléculas do produto, o piruvato. A equação global final para a glicólise é:

$$\text{Glicose} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow$$
$$2\text{ piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \quad (15\text{-}1)$$

Para cada molécula de glicose degradada até piruvato, duas moléculas de ATP são geradas a partir de ADP e P$_i$. Podemos agora dividir a equação da glicólise em dois processos:

(1) a conversão de glicose em piruvato, que é exergônica:

$$\text{Glicose} + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \quad (15\text{-}2)$$
$$\Delta G_1'^{\circ} = -146\text{kJ/mol}$$

(2) a formação de ATP a partir de ADP e P$_i$ que é endergônica:

$$2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \quad (15\text{-}3)$$
$$\Delta G_2'^{\circ} = 2(30{,}5\text{kJ/mol}) = 61\text{kJ/mol}$$

Se, agora, calcularmos a soma das Equações 15-2 e 15-3, poderemos determinar a variação da energia livre padrão total da glicólise (Equação 15-1), incluindo a formação do ATP, como a soma algébrica, $\Delta G_s'^{\circ}$, de $\Delta G_1'^{\circ}$ e $\Delta G_2'^{\circ}$:

$$\Delta G_s'^{\circ} = \Delta G_1'^{\circ} + \Delta G_2'^{\circ} = -146\text{kJ/mol} + 61\text{kJ/mol} = -85\text{kJ/mol}$$

Tanto sob as condições padrão como sob as condições intracelulares, a glicólise é um processo essencialmente irreversível, conduzida até se completar por esse grande decréscimo líquido da energia livre. Nas concentrações intracelulares reais de ATP, ADP e P$_i$ (veja Tabela 13-5) e de glicose e piruvato, a eficiência da recuperação ou conservação da energia da glicólise na forma de ATP é maior que 60%.

Energia que permanece no piruvato. A glicólise libera apenas uma pequena fração da energia total disponível na molécula da glicose. Quando a glicose é completamente oxidada a CO$_2$ e H$_2$O, a variação total de energia livre padrão é –2.840kJ/mol. A degradação da glicose na via glicolítica até duas moléculas de piruvato ($\Delta G'^{\circ} = -146$kJ/mol) libera portanto apenas (146/2.840)100 = 5,2% da energia total que pode ser obtida da glicose pela oxidação completa. As duas moléculas de piruvato formadas pela glicólise ainda retêm a maior parte da energia potencial química existente na molécula da glicose; essa energia pode ser extraída por meio de reações oxidativas no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16) e da fosforilação oxidativa (Capítulo 19).

A importância dos intermediários fosforilados. Todos os nove intermediários da glicólise situados entre a glicose e o piruvato são fosforilados (Fig. 15-2). Os grupos fosfato parecem ter três funções:

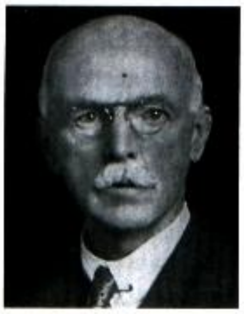
1. Os grupos fosfato são ionizados em pH 7, dando assim a cada um dos intermediários da glicólise uma carga líquida negativa. Como a membrana plasmática é impermeável às moléculas que exibem cargas elétricas, os intermediários fosforilados não podem se difundir para fora da célula. Depois da fosforilação inicial, a célula não necessita mais despender energia para reter os intermediários fosforilados, a despeito da grande diferença entre as concentrações intra e extracelulares desses compostos.

2. Os grupos fosfato são componentes essenciais na conservação enzimática da energia metabólica. A energia liberada na quebra de ligações de anidridos do ácido fosfórico (como aquelas no ATP) é parcialmente conservada na formação de ésteres de fosfato, tais como a glicose-6-fosfato. Os compostos fosfóricos de alta energia, formados na glicólise (1,3-bifosfoglicerato e fosfoenolpiruvato), doam grupos fosfato ao ADP para formar ATP.

3. A ligação de grupos fosfato aos sítios ativos das enzimas fornece energia de ligação que contribui para baixar a energia de ativação e aumentar a especificidade das reações catalisadas enzimaticamente (veja pág. 194). Os grupos fosfato do ATP, ADP e dos intermediários glicolíticos formam complexos com Mg^{2+} e os sítios de ligação dos substratos de muitas das enzimas glicolíticas são específicos para esses complexos de Mg^{2+}. A maioria das enzimas glicolíticas requerem Mg^{2+} para entrar em atividade.

A fase preparatória da glicólise requer ATP

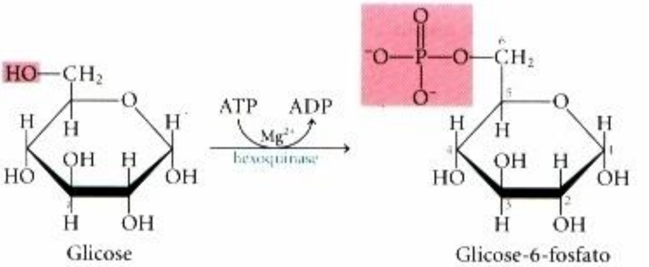
A fase preparatória da glicólise requer o investimento de duas moléculas de ATP e resulta na clivagem da cadeia da hexose em duas trioses fosfato. A compreensão de que as hexoses *fosforiladas* são intermediárias na glicólise foi conseguida de maneira lenta e algo casual. Em 1906, Arthur Harden e William Young procuravam testar sua hipótese de que os inibidores das enzimas proteolíticas estabilizavam as enzimas da fermentação da glicose nos extratos de levedura. Eles adicionaram soro sangüíneo (sabia-se que ele continha inibidores de enzimas proteolíticas) em extratos de levedura e observaram o estímulo predito do metabolismo da glicose. Entretanto, por meio de um experimento-controle, realizado com a intenção de demonstrar que ao ferver o soro destrói-se a atividade estimulante, eles descobriram que o soro fervido era um estimulador da glicólise tão efetivo quanto o soro não aquecido. O exame cuidadoso do conteúdo do soro fervido revelou que os íons de fosfato inorgânico eram os responsáveis pela estimulação. Harden e Young logo descobriram que a glicose adicionada a seus extratos de levedura era convertida em uma hexose bifosfato (o chamado "éster de Harden-Young", eventualmente identificado como frutose-1,6-bifosfato). Esse foi o início de uma longa série de investigações sobre o papel dos ésteres orgânicos de fosfato na bioquímica, que levaram a nosso atual conhecimento do papel central das transferências do grupo fosfato em biologia.



Arthur Harden
(1865-1940)

William Young
(1878-1942)

① Fosforilação da glicose. No primeiro passo da glicólise, a glicose é ativada para as reações subseqüentes pela sua fosforilação em C-6 para liberar a **glicose-6-fosfato**; o doador de fosfato é o ATP:



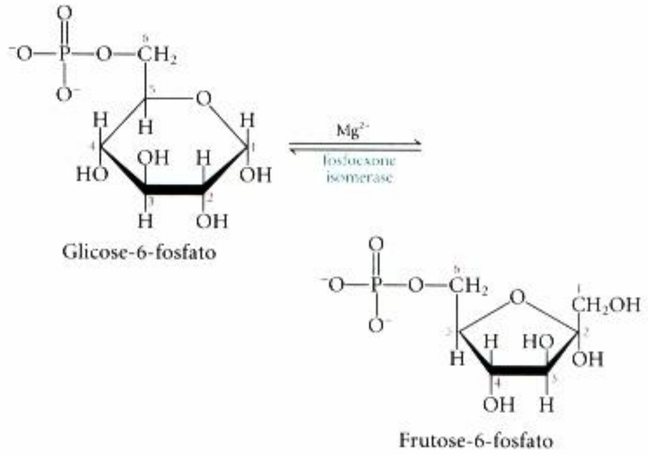
$\Delta G'^{\circ} = -16{,}7\text{kJ/mol}$

Esta reação, que é irreversível sob as condições intracelulares, é catalisada pela **hexoquinase.** O nome comum **quinase** é aplicado a todas as enzimas que catalisam a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para um receptor nucleofílico qualquer — uma hexose, no caso da hexoquinase. As quinases são uma subclasse das transferases (veja Tabela 8-3). A hexoquinase catalisa a fosforilação não apenas da D-glicose, mas também de certas outras hexoses comuns, como a D-frutose e a D-manose.

Para ser ativa, a hexoquinase, como muitas outras quinases, requer Mg^{2+}, porque o verdadeiro substrato da enzima não é ATP^{4-}, mas sim o complexo $MgATP^{2-}$ (veja Fig. 14-2). Estudos detalhados da hexoquinase da levedura mostraram que a enzima sofre uma profunda mudança na sua forma, um ajuste induzido, quando a ela se liga a molécula de hexose (veja Fig. 8-21). A hexoquinase está universalmente presente em todos os tipos de células. Os hepatócitos também contêm uma forma de hexoquinase chamada de hexoquinase D ou glicoquinase, a qual é mais específica para a glicose e difere de outras formas da hexoquinase por suas propriedades cinéticas e reguladoras (pág. 430).

Como as demais nove enzimas da via glicolítica, a hexoquinase é uma proteína citosólica solúvel, entretanto, como veremos depois, podem ocorrer complexos organizados de várias enzimas glicolíticas (veja Fig. 15-8).

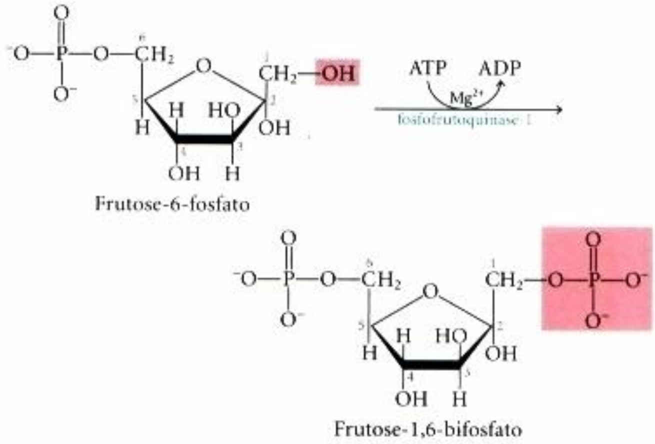
② Conversão da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. A enzima **fosfoexose isomerase (fosfoglicose isomerase)** catalisa a isomerização reversível de uma aldose, a glicose-6-fosfato, em uma cetose, a **frutose-6-fosfato**:



$\Delta G'^{\circ} = -1{,}7\text{kJ/mol}$

Como previsto pela variação relativamente pequena da energia livre padrão, esta reação se processa rapidamente em qualquer das duas direções. A fosfoexose isomerase também requer Mg^{2+} e é específica para as duas hexoses — glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato.

③ Fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato. Na segunda das duas reações de ativação da glicólise, a **fosfofrutoquinase-1** catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para a frutose-6-fosfato para liberar a **frutose-1,6-bifosfato**:



$\Delta G'^{\circ} = -14{,}2\text{kJ/mol}$

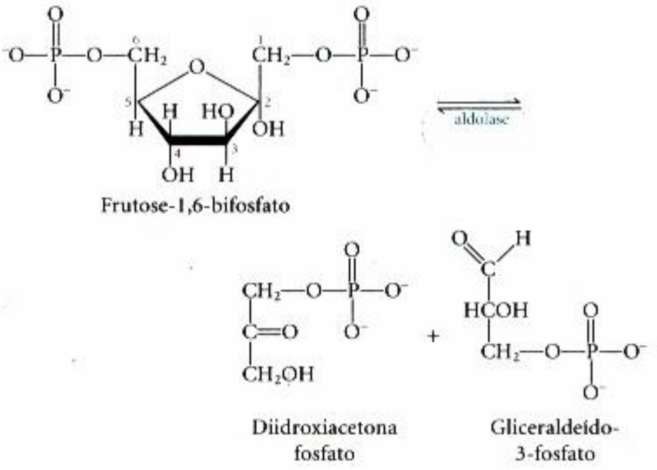
A reação é essencialmente irreversível nas condições celulares. Esta enzima é chamada fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) para distingui-la de uma segunda enzima (PFK-2) que catalisa a formação da frutose-2,6-bifosfato a partir da frutose-6-fosfato (veja Fig. 20-8).

Algumas bactérias e protistas e, talvez, todos os vegetais possuem uma fosfofrutoquinase que usa o pirofosfato (PP_i), e não o ATP, como o doador do grupo fosfato na síntese da frutose-1,6-bifosfasto:

$$\text{Frutose-6-fosfato} + PP_i \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{frutose-1,6-bifosfato} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -14\text{kJ/mol}$$

A fosfofrutoquinase-1, como a hexoquinase, é uma enzima reguladora (Capítulo 8) e, entre as conhecidas, uma das mais complexas. Ela representa o ponto principal de regulação da glicólise. A atividade da PFK-1 é aumentada sempre que o suprimento de ATP da célula se torna baixo ou quando existe um excesso dos produtos da hidrólise do ATP, ADP e AMP, particularmente deste último. Essa enzima é inibida sempre que a célula tem amplo suprimento de ATP e quando ela está bem suprida de outros combustíveis como os ácidos graxos. A frutose-2,6-bifosfato não deve ser confundida com a frutose-1,6-bifosfato que é o produto da ação da PFK-1 e não é um intermediário da glicólise, mas sim um potente ativador alostérico da fosfofrutoquinase-1. A regulação deste passo da glicólise será discutida mais detalhadamente, neste mesmo capítulo.

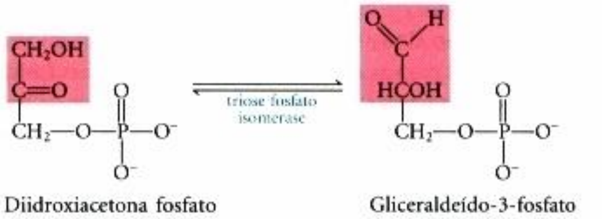
④ Clivagem da frutose-1,6-bifosfato. A enzima **frutose-1,6-bifosfato aldolase**, em geral simplesmente chamada **aldolase**, catalisa a condensação reversível de grupos aldol. A frutose-1,6-bifosfato é quebrada para liberar duas trioses fosfato diferentes, o **gliceraldeído-3-fosfato**, uma aldose, e a **diidroxiacetona fosfato**, uma cetose:


Frutose-1,6-bifosfato
aldolase
Diidroxiacetona fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato

$\Delta G'^{\circ} = 23{,}8\text{kJ/mol}$

A aldolase dos tecidos dos animais vertebrados não requer um cátion divalente, porém em muitos microrganismos a aldolase é uma enzima que contém Zn^{2+}. Embora a reação da aldolase tenha uma variação da energia livre padrão fortemente positiva na direção da divisão da frutose-1,6-bifosfato, na célula ela pode ocorrer livremente nas duas direções. Durante a glicólise, os produtos da reação (as duas trioses fosfato) são removidas rapidamente pelos dois próximos passos, deslocando a reação na direção da divisão.

⑤ A interconversão das trioses fosfato. Apenas uma das trioses fosfato formada pela aldolase — o gliceraldeído-3-fosfato — pode ser diretamente degradada nos passos subseqüentes da glicólise. Entretanto, o outro produto, a diidroxiacetona fosfato, é rápida e reversivelmente convertido em gliceraldeído-3-fosfato pela quinta enzima da seqüência glicolítica, a **triose fosfato isomerase**:


triose fosfato isomerase
Diidroxiacetona fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato

$\Delta G'^{\circ} = 7{,}5\text{kJ/mol}$

Por esta reação, C-1, C-2 e C-3 da glicose inicial agora tornam-se indistinguíveis de C-6, C-5 e C-4, respectivamente (Fig. 15-4).

Esta reação completa a fase preparatória da glicólise; nela a molécula de hexose foi fosforilada em C-1 e C-6 e então dividida para formar, em última instância, duas moléculas do gliceraldeído-3-fosfato. Outras hexoses como D-frutose, D-manose e D-galactose também são conversíveis em gliceraldeído-3-fosfato, como veremos mais adiante.

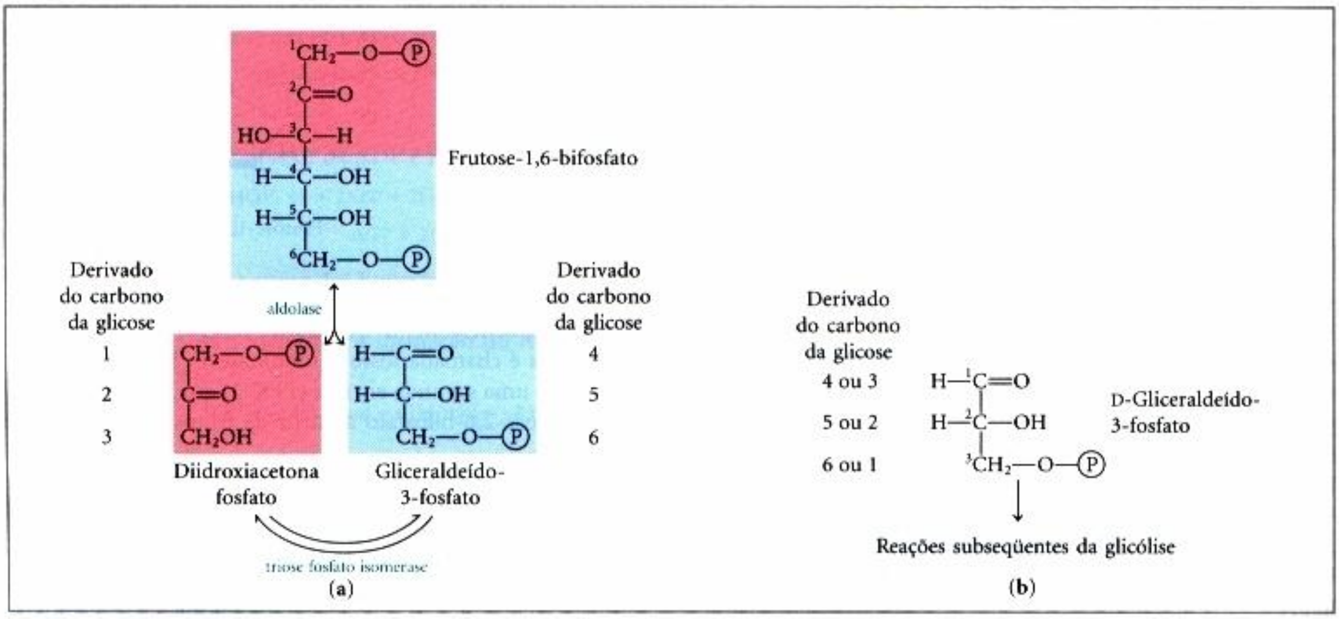
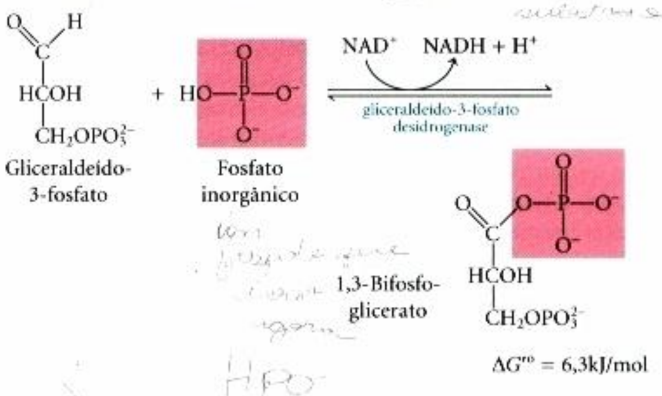

Frutose-1,6-bifosfato
aldolase
Derivado do carbono da glicose
1
2
3
4
5
6
Diidroxiacetona fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
triose fosfato isomerase
(a)
Derivado do carbono da glicose
4 ou 3
5 ou 2
6 ou 1
D-Gliceraldeído-3-fosfato
Reações subseqüentes da glicólise
(b)

Figura 15-4 – Destino dos átomos de carbono da glicose na formação do gliceraldeído-3-fosfato. (**a**) A origem dos átomos de carbono nos compostos com três carbonos produzidos nas reações da aldolase e da triose fosfato isomerase. Após as duas reações, o produto final obtido são duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. Cada um dos três átomos de carbono do gliceraldeído-3-fosfato é derivado de um ou outro de dois átomos de carbono específicos da glicose. (**b**) A numeração dos átomos de carbono do gliceraldeído-3-fosfato não é idêntica à numeração dos átomos de carbono da glicose da qual ele é derivado. No gliceraldeído-3-fosfato, o grupo funcional mais complexo (o grupo carbonila) é especificado como C-1. Essa mudança na numeração é importante para a interpretação de experimentos nos quais um único átomo de carbono da glicose é marcado radioisotopicamente. (Veja os Problemas 3 e 5 no final deste capítulo.)

A fase de pagamento da glicólise produz ATP e NADH

A fase de pagamento da glicólise (veja Fig. 15-2b) inclui os passos de fosforilação conservadores da energia, nos quais parte da energia livre contida na molécula da glicose é conservada na forma de ATP. Lembre-se de que uma molécula de glicose libera duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato; na segunda fase da glicólise as duas metades da molécula da glicose seguem a mesma via. A conversão das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato em duas moléculas de piruvato é acompanhada pela formação de quatro moléculas de ATP, formadas a partir de ADP. Entretanto, o rendimento líquido de ATP por molécula de glicose degradada é apenas dois, porque duas moléculas de ATP foram investidas na fase preparatória da glicólise para fosforilar as duas extremidades da molécula de hexose.

⑥ Oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. O primeiro passo da fase de pagamento da glicólise é a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em **1,3-bifosfoglicerato**, catalisado pela **gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase**:



HPO

Esta é a primeira das duas reações conservadoras da energia da glicólise, que eventualmente levam à formação do ATP. O grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é desidrogenado, não como se poderia esperar, em um grupo carboxila livre, mas em um anidrido de ácido carboxílico com o ácido fosfórico. Esse tipo de anidrido, chamado um **acil-fosfato**, tem uma energia livre padrão de hidrólise muito alta ($\Delta G'^\circ = -49{,}3$kJ/mol; veja Fig. 14-4 e Tabela 14-6). A maior parte da energia livre de oxidação do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é conservada pela formação do grupo acil-fosfato em C-1 do 1,3-bifosfoglicerato.

O receptor de hidrogênio na reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é a coenzima NAD^+ (veja Fig. 14-15). A redução do NAD^+ ocorre pela transferência enzimática de um íon hidreto ($:H^-$) do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato para o anel nicotinamida do NAD^+, para liberar a coenzima reduzida NADH. O outro átomo de hidrogênio da molécula do substrato aparece em solução como H^+.

O gliceraldeído-3-fosfato está covalentemente ligado à enzima durante a reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Fig. 15-5). O grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato reage primeiro com o grupo —SH de um resíduo essencial de cisteína no sítio ativo da enzima. Essa reação é homóloga com a formação de um hemiacetal (veja Fig. 9-5), mas nesse caso o produto é um *tioemiacetal.* A descoberta de que a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é inibida por iodoacetato foi importante na história da pesquisa sobre glicólise; a adição desse inibidor enzimático a extratos brutos de levedura ou de músculo provocava o acúmulo das hexoses fosfato produzidas na glicólise, permitindo seu isolamento e identificação.

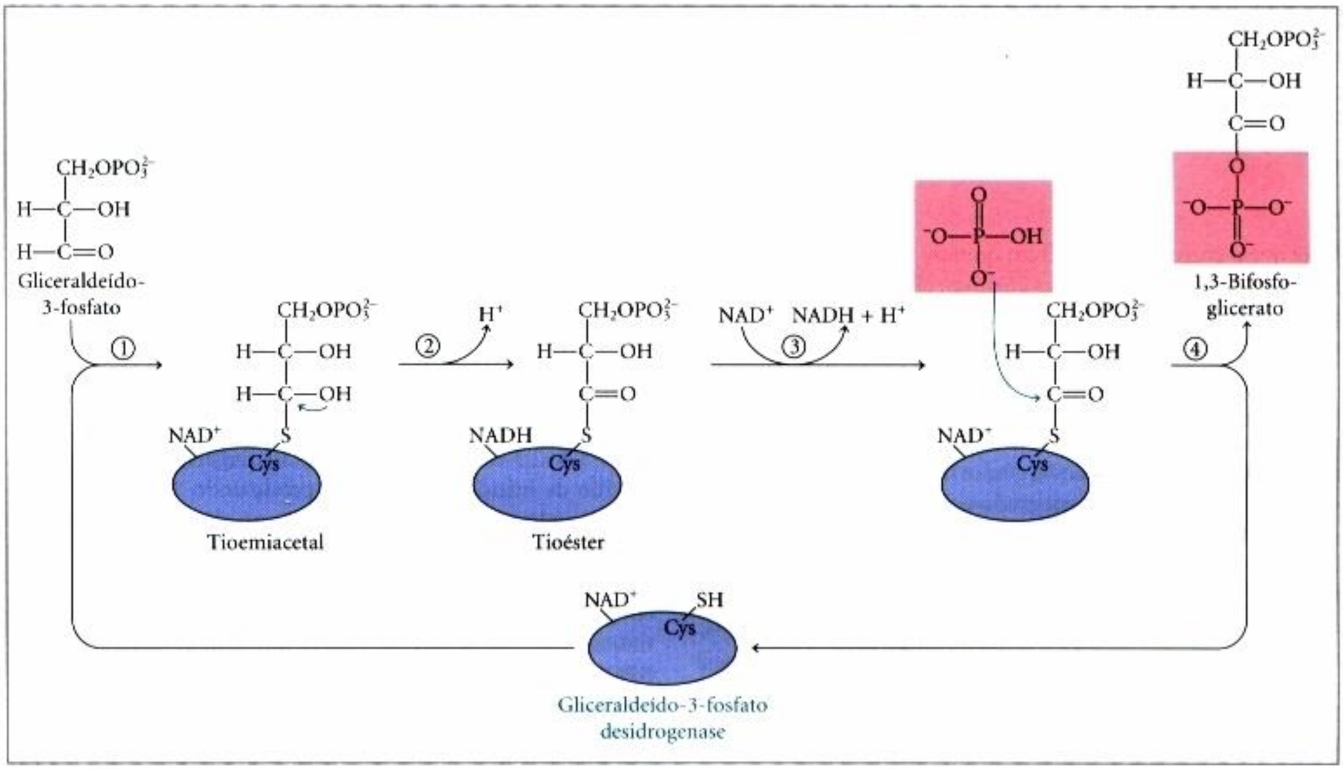
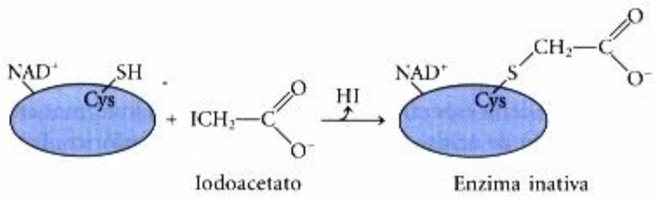


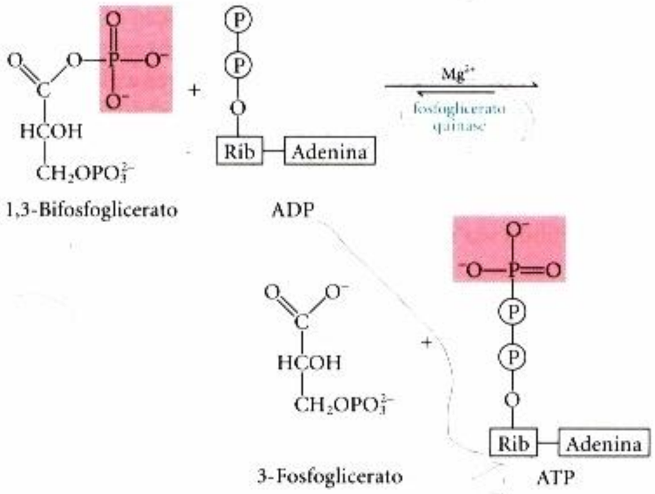
Figura 15-5 – Uma representação mais detalhada da reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. No passo ①, forma-se uma ligação covalente tioemiacetal entre o substrato e o grupo sulfidrila —SH de um resíduo de cisteína no sítio ativo da enzima. Esse intermediário enzima-substrato é oxidado pelo NAD^+ (passo ②) também ligado ao sítio ativo, convertendo-se em um intermediário covalente acil-enzima, um tioéster. O NADH ligado à enzima é reoxidado pelo NAD^+ livre (passo ③). A ligação entre o grupo acila e o grupo tiol da enzima tem uma energia livre padrão de hidrólise muito alta. No passo ④, a ligação tioéster sofre fosforólise (ataque por P_i), liberando a enzima livre e um produto acil-fosfato (1,3-bifosfoglicerato), a formação deste conserva a maior parte da energia livre liberada durante a oxidação do grupo aldeído de gliceraldeído-3-fosfato.



O iodoacetato é um inibidor potente da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, porque forma um derivado covalente com o grupo —SH do sítio ativo da enzima, tornando-a inativa.

Como as células contêm quantidades limitadas de NAD^+, a glicólise logo se deteria por falta de NAD^+ caso o NADH não fosse reoxidado continuamente. As reações nas quais o NAD^+ é regenerado anaerobicamente são descritas em detalhes adiante, em conexão com os destinos alternativos do piruvato.

⑦ **Transferência do fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP**. A enzima **fosfoglicerato quinase** transfere o grupo fosfato de alta energia do grupo carboxila do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, formando ATP e **3-fosfoglicerato:**



$\Delta G'^{\circ} = -18{,}5\text{kJ/mol}$

Note que a enzima fosfoglicerato quinase recebe seu nome pela reação inversa. Como todas as enzimas, ela catalisa a reação em ambas as direções. Essa enzima age na direção sugerida pelo seu nome durante a fixação fotossintética do CO_2 (veja Fig. 20-25).

Juntos, os passos ⑥ e ⑦ da glicólise constituem um processo acoplador de transferência de energia. Nestas duas reações, o intermediário comum é o 1,3-bifosfoglicerato; ele é formado na primeira reação (que é endergônica) e na segunda reação (que é fortemente exergônica), seu grupo acil-fosfato é transferido ao ADP, para formar ATP. A soma das duas reações em seqüência é:

$$\text{Gliceraldeído-3-fosfato} + \text{ADP} + P_i + NAD^+ \rightleftharpoons \text{3-fosfoglicerato} + \text{ATP} + \text{NADH} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -12{,}5\text{kJ/mol}$$

Portanto a reação global é exergônica.

Lembre-se (Capítulo 14) de que a variação da energia livre *real*, ΔG, é determinada pela variação da energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$, e pela lei da ação das massas, que é a relação [produtos]/[reagentes] (ver Eq. 14-3). Para o passo ⑥:

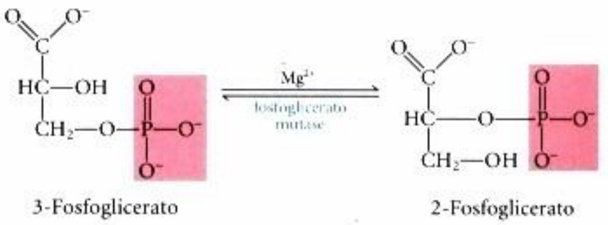
$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{1,3-bifosfoglicerato}][\text{NADH}]}{[\text{gliceraldeído-3-fosfato}][P_i][NAD^+]}$$

Note que $[H^+]$ não está incluída na relação da ação das massas para esta reação. Nos cálculos bioquímicos $[H^+]$ é uma constante (10^{-7}M) e essa constante está incluída na definição de $\Delta G'^{\circ}$ (veja pág. 386).

A segunda reação (passo ⑦) reduz a concentração de 1,3-bifosfoglicerato pelo consumo desse derivado produzido na primeira reação e, assim, diminui o valor da relação entre as massas de reagentes e os produtos do processo global. Quando essa relação é menor que 1,0, o seu logaritmo natural tem um sinal negativo. Se a relação das massas for muito pequena, a contribuição do termo logarítmico pode fazer ΔG fortemente negativa. Essa é, simplesmente, outra forma de demonstrar que as duas reações, passos ⑥ e ⑦, são acopladas por meio de um intermediário compartilhado.

O resultado do acoplamento dessas duas reações, ambas reversíveis nas condições celulares, é que a energia, liberada na oxidação de um aldeído a um grupo carboxilato, é conservada pela formação concomitante de ATP com o emprego de ADP e P_i. A formação de ATP pela transferência de um grupo fosfato de um substrato como o 1,3-bifosfoglicerato é referida como **fosforilação no nível do substrato** para distinguir seu mecanismo daquele da **fosforilação ligada à respiração.** As fosforilações no nível do substrato envolvem enzimas solúveis e intermediários químicos (1,3-bifosfoglicerato, neste caso). As fosforilações ligadas à respiração celular, por outro lado, envolvem enzimas presas em membranas e gradientes transmembranosos de prótons (Capítulo 19).

⑧ **Conversão do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato.** A enzima **fosfoglicerato mutase** catalisa a transferência reversível do grupo fosforil entre C-2 e C-3 do glicerato. O íon Mg^{2+} é essencial para esta reação:



$\Delta G'^{\circ} = 4{,}4\text{kJ/mol}$

A reação ocorre em dois passos (Fig. 15-6). Um grupo fosforil, inicialmente ligado a um resíduo de histidina no sítio ativo da enzima, é transferido para o grupo hidroxila em C-2 do 3-fosfoglicerato, formando 2,3-bifosfoglicerato (BPG). O grupo fosforil em C-3 do 2,3-bifosfoglicerato é então transferido para o mesmo resíduo de histidina da enzima, produzindo 2-fosfoglicerato e regenerando a enzima fosforilada. Como a enzima é inicialmente fosforilada pela transferência de fosfato do 2,3-bifosfoglicerato, esse composto funciona como um co-fator; ele é requerido em pequenas quantidades para iniciar o ciclo catalítico e é continuamente regenerado por esse ciclo. Na maioria das células, o BPG está presente em concentrações mínimas, mas nos eritrócitos, em que regula a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (veja Fig. 7-16), sua concentração é alta, próxima a 5mM.

A enzima fosfoglicomutase (pág. 425) emprega o mesmo mecanismo da fosfoglicero mutase descrito a seguir na conversão da glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato. Nesta reação, a glicose-1,6-bifosfato serve como co-fator inicial. O nome geral **mutase** é dado a enzimas que catalisam a transferência de um grupo funcional de uma posição para outra na mesma molécula de

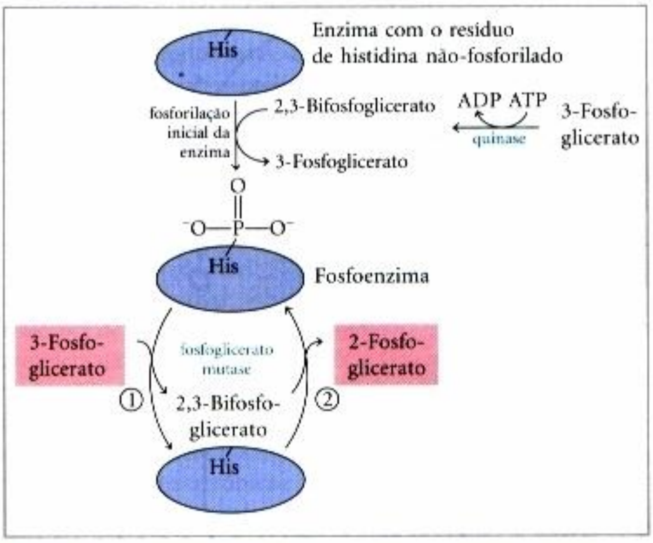
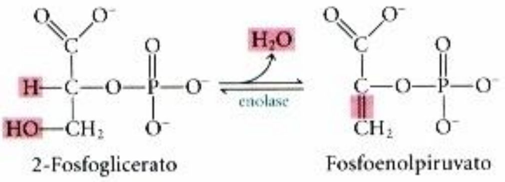

His
Enzima com o resíduo de histidina não-fosforilado
fosforilação inicial da enzima
2,3-Bifosfoglicerato
ADP ATP
quinase
3-Fosfoglicerato
3-Fosfoglicerato
Fosfoenzima
3-Fosfoglicerato
fosfoglicerato mutase
2-Fosfoglicerato
①
2,3-Bifosfoglicerato
②

Figura 15-6 – Mecanismo da reação da fosfogliceratomutase. A enzima é inicialmente fosforilada em um resíduo de histidina pela transferência de um grupo fosforil do 2,3-bifosfoglicerato (BPG). No passo ① da reação catalítica, a fosfoenzima transfere o grupo fosforil para o 3-fosfoglicerato, formando 2,3-bifosfoglicerato. No passo ②, o grupo fosforil em C-3 do 2,3-bifosfoglicerato é transferido para o mesmo resíduo de histidina na enzima, produzindo 2-fosfoglicerato e regenerando a fosfoenzima. O 2,3-bifosfoglicerato requerido inicialmente para fosforilar a enzima é formado a partir do 3-fosfoglicerato pela ação de uma quinase específica dependente de ATP; ele é então regenerado no passo ① de cada ciclo catalítico.

substrato. As mutases são uma subclasse das **isomerases**, enzimas que interconvertem estereoisômeros, isômeros estruturais ou posicionais (veja Tabela 8-3).

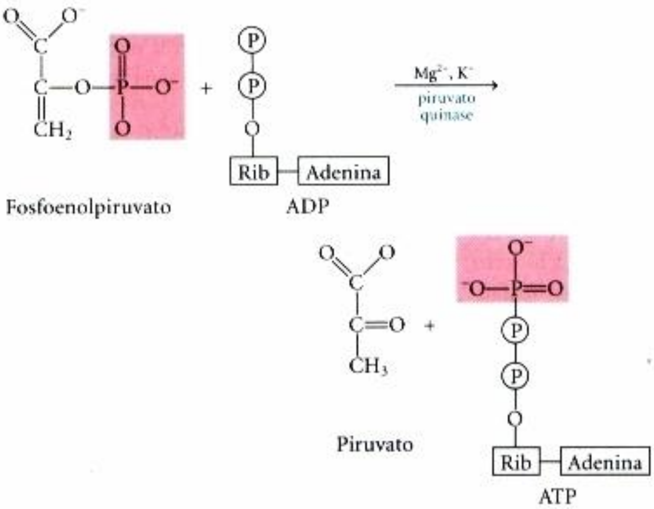
⑨ Desidratação do 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato. A segunda reação glicolítica que gera um composto com alto potencial de transferência de grupo fosforil é catalisada pela **enolase**. Essa enzima promove a remoção reversível de uma molécula de água do 2-fosfoglicerato para liberar **fosfoenolpiruvato**:


H₂O
enolase
2-Fosfoglicerato
Fosfoenolpiruvato

$\Delta G'^{\circ} = 7{,}5\text{kJ/mol}$

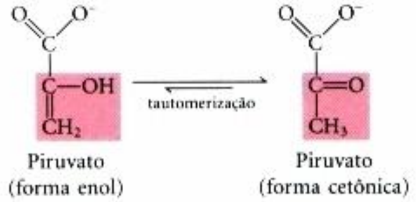
A despeito da variação relativamente pequena da energia livre padrão nesta reação, há uma grande diferença da energia livre padrão de hidrólise do grupo fosfato do reagente e do mesmo grupo do produto. Aquela do 2-fosfoglicerato (um composto de fosfato de baixa energia) é –17,6kJ/mol e aquela do fosfoenolpiruvato (um composto fosfato de energia superalta) é –61,9kJ/mol (veja Fig. 14-3 e Tabela 14-6). Embora o 2-fosfoglicerato e o fosfoenolpiruvato contenham, cada um, perto da mesma quantidade *total* de energia, a saída da molécula de água do 2-fosfoglicerato provoca a redistribuição da energia interna da molécula; a variação da energia livre que acompanha a hidrólise do grupo fosfato é muito maior para o fosfoenolpiruvato que para o 2-fosfoglicerato.

⑩ Transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato para o ADP. O último passo na glicólise é a transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato para o ADP, catalisada pela **piruvato quinase**, uma enzima que requer K^+ e ou Mg^{2+} ou Mn^{2+}:


Mg²⁺, K⁺
piruvato quinase
Rib
Adenina
Fosfoenolpiruvato
ADP
Piruvato
Rib
Adenina
ATP

$\Delta G'^{\circ} = -31{,}4\text{kJ/mol}$

Nesta reação, de fosforilação no nível do substrato, o produto **piruvato** aparece primeiro na sua forma enol. Entretanto, a forma enol tautomeriza de maneira rápida, embora não enzimática, para liberar a forma cetônica do piruvato, a forma que predomina em pH 7. A reação total tem uma variação de energia livre padrão grande e negativa, devido em grande parte à conversão espontânea da forma enol do piruvato em sua forma cetônica (veja Fig. 14-3). A $\Delta G'^{\circ}$ da hidrólise do fosfoenolpiruvato é –61,9kJ/mol; cerca de metade dessa energia é conservada na formação da ligação de anidrido do ácido fosfórico do ATP ($\Delta G'^{\circ} = -30{,}5\text{kJ/mol}$) e o restante (–31,4kJ/mol) constitui uma grande força que empurra a reação no sentido da síntese do ATP. A reação da piruvato quinase é essencialmente irreversível sob condições intracelulares e é um importante sítio de regulação, como será descrito adiante.


tautomerização
Piruvato (forma enol)
Piruvato (forma cetônica)

O balanço final mostra um ganho líquido de ATP

Podemos montar agora um balanço da glicólise para demonstrar: (1) o destino do esqueleto carbônico da glicose; (2) a entrada de P_i e ADP e a saída de ATP, e (3) o caminho dos elétrons nas reações de oxidação-redução. O lado esquerdo da equação a seguir mostra todas as entradas de ATP, NAD^+, ADP e P_i (veja Fig. 15-2), e o lado direito mostra todas as saídas (mantenha em mente que cada molécula de glicose libera duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato):

$$\text{Glicose} + 2\text{ATP} + 2\text{NAD}^+ + 4\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{ADP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 4\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Se cancelarmos os termos comuns dos dois lados da equação, teremos a equação final da glicólise em condições aeróbicas:

$$\text{Glicose} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

As duas moléculas de NADH formadas pela glicólise no citosol são, em condições aeróbicas, reoxidadas em NAD^+ pela transferência dos seus elétrons para a cadeia respiratória, localizada nas mitocôndrias nas células eucarióticas. Aqui, esses elétrons são, em última instância, passados para o O_2:

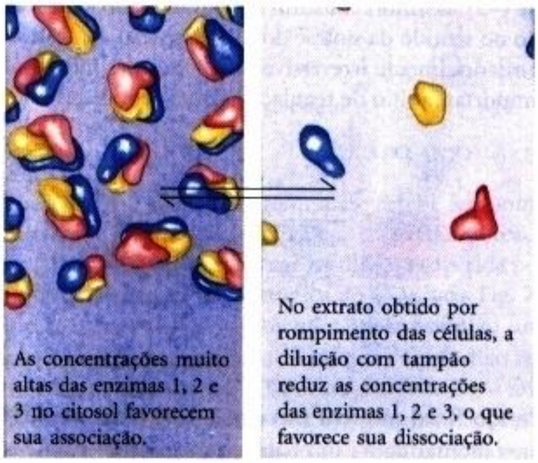
$$2NADH + 2H^+ + O_2 \longrightarrow 2NAD^+ + 2H_2O$$

A transferência de elétrons do NADH para o O_2 nas mitocôndrias fornece a energia para a síntese do ATP pela fosforilação ligada à respiração (Capítulo 19).

No cômputo final do processo, uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de piruvato (a via do carbono). Duas moléculas de ADP e duas de P_i são convertidas em duas moléculas de ATP (a via dos grupos fosfato). Quatro elétrons (dois íons hidreto) são transferidos de duas moléculas do gliceraldeído-3-fosfato para duas de NAD^+ (a via dos elétrons).

Os intermediários são canalizados entre as enzimas glicolíticas

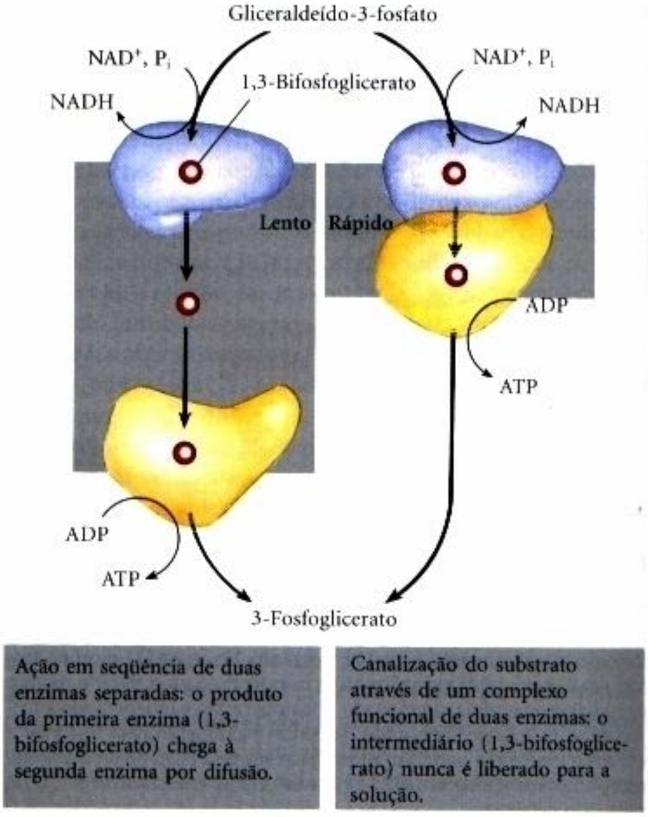
Embora as enzimas da glicólise usualmente sejam descritas como componentes solúveis do citosol, há evidências crescentes de que dentro das células essas enzimas existem como complexos multienzimáticos. A abordagem clássica da enzimologia — a purificação de proteínas individuais de extratos de células rompidas — foi aplicada com grande sucesso para as enzimas da glicólise; como vimos até aqui, cada uma dessas enzimas já foi purificada até a homogeneidade. Entretanto, a primeira vítima do rompimento da célula é o alto nível de organização do interior celular — a interação reversível e não-covalente de uma proteína com outra, ou de uma enzima com algum componente estrutural, como uma membrana, microtúbulos ou microfilamentos. Quando as células são abertas por rompimento de sua membrana plasmática, seu conteúdo, incluindo as enzimas, é diluído centenas ou até mesmo milhares de vezes (Fig. 15-7).



As concentrações muito altas das enzimas 1, 2 e 3 no citosol favorecem sua associação.

No extrato obtido por rompimento das células, a diluição com tampão reduz as concentrações das enzimas 1, 2 e 3, o que favorece sua dissociação.

Figura 15-7 – A diluição de uma solução contendo um complexo protéico não-covalente favorece a dissociação do complexo em seus constituintes.



Ação em seqüência de duas enzimas separadas: o produto da primeira enzima (1,3-bifosfoglicerato) chega à segunda enzima por difusão.

Canalização do substrato através de um complexo funcional de duas enzimas: o intermediário (1,3-bifosfoglicerato) nunca é liberado para a solução.

Figura 15-8 – Canalização de um substrato entre duas enzimas na via glicolítica. Quando a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (azul) e a 3-fosfoglicerato quinase (amarelo) são combinadas *in vitro*, elas catalisam a conversão em dois passos do gliceraldeído-3-fosfato a 3-fosfoglicerato (veja Figs. 15-5 e 15-6) em uma velocidade maior que a velocidade na qual o primeiro passo é catalisado na presença apenas da primeira enzima. Aparentemente, a transferência do 1,3-bifosfoglicerato da superfície da desidrogenase para a superfície da quinase é mais rápida que a dissociação do 1,3-bifosfoglicerato da desidrogenase no meio ambiente aquoso (o que ocorre na ausência da quinase). Estudos físicos mostram que as duas enzimas podem formar um complexo estável, como é necessário para haver canalização do substrato entre elas.

Quando as enzimas purificadas da glicólise são combinadas *in vitro* em concentrações relativamente altas, elas formam agregados funcionais e específicos que podem refletir o seu estado verdadeiro no interior das células. Vários tipos de evidências sugerem que, nas células, esses complexos garantem uma passagem eficiente do produto de uma enzima para a próxima enzima na via, para a qual esse produto funciona como substrato. A evidência cinética da existência de uma **canalização** do 1,3-bifosfoglicerato que sai da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase para a fosfoglicerato quinase sem entrar em solução (Fig. 15-8) é corroborada pelas evidências físicas de que essas duas enzimas formam complexos não-covalentes estáveis. Há evidências similares para a canalização de intermediários entre outras enzimas glicolíticas, como é o caso do gliceraldeído-3-fosfato da aldolase para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Ainda mais, certas enzimas glicolíticas formam complexos específicos não-covalentes com componentes estruturais das células, os quais podem servir para organizar seqüências de reações e assegurar a transferência eficiente de intermediários entre os compartimentos celulares. Por exemplo, a fosfofrutoquinase-1 e a aldolase se ligam aos microfilamentos da actina e isso provoca associação íntima entre elas e altera as propriedades cinéticas da aldolase (K_m e $V_{máx}$ são, ambos, aumentados). A hexoquinase liga-se especificamente à membrana externa da mitocôndria. Essa associação pode permitir que o ATP, uma vez produzido no interior da mitocôndria, possa mover-se diretamente para o sítio catalítico da hexoquinase sem entrar, e ser diluído, no citosol. Existem fortes evidências de canalização de substratos entre complexos multienzimáticos em outras vias metabólicas, e parece muito provável que muitas enzimas que hoje são tidas como "solúveis" na realidade funcionam nas células como complexos altamente organizados que canalizam os intermediários metabólicos entre si.

A glicólise é estreitamente regulada

Durante seus estudos sobre a fermentação da glicose por leveduras, Louis Pasteur descobriu que tanto a velocidade da fermentação quanto a quantidade total de glicose por ela consumida eram muitas vezes maiores sob condições anaeróbicas do que sob condições aeróbicas. Estudos posteriores dos músculos mostraram a mesma grande diferença na velocidade da glicólise em condições anaeróbicas e aeróbicas. A base bioquímica desse fenômeno, chamado "efeito Pasteur", é agora clara. O rendimento em ATP da glicólise sob condições anaeróbicas (2 ATP por molécula de glicose) é muito menor que o obtido na oxidação completa da glicose até CO_2 e H_2O sob condições aeróbicas (30 ou 32 ATP por molécula de glicose; veja Tabela 19-5). Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP, é necessário consumir perto de 18 vezes mais glicose em condições anaeróbicas do que nas condições aeróbicas.

O fluxo de glicose através da via glicolítica é regulado para manter constante a concentração de ATP (bem como fluxos adequados de suprimentos dos intermediários glicolíticos que possuem destinos biossintéticos). Para esse fim, os necessários ajustes na velocidade da glicólise são conseguidos pela regulação de duas enzimas dessa via: a fosfofrutoquinase-1 e a piruvato quinase. Essas duas enzimas são reguladas alostericamente, segundo a segundo, pelas flutuações na concentração de certos metabólitos-chave que refletem o equilíbrio celular entre a produção e o consumo de ATP. Ainda neste capítulo, voltaremos a uma discussão mais detalhada da regulação da glicólise.

Nos tecidos cancerosos o catabolismo da glicose está desordenado

A captação da glicose e a glicólise ocorrem perto de dez vezes mais rápido na maioria dos tumores sólidos do que nos tecidos normais. As células tumorais freqüentemente experimentam hipóxia (suprimento limitado de oxigênio) porque o tumor sofre a falta de uma rede capilar sangüínea suficiente para supri-lo de oxigênio. Disso resulta que as células tumorais distantes mais de 100 a 200μm do capilar mais próximo dependem de forma exclusiva da via glicolítica para a maior parte de sua produção de ATP. As células tumorais captam mais glicose que as normais e as convertem em lactato para reoxidar o NADH. A velocidade aumentada da glicólise pode resultar também do menor número de mitocôndrias existente nas células tumorais; menos ATP sintetizado por fosforilação oxidativa nas mitocôndrias significa que uma maior quantidade dele precisará ser sintetizada pela glicólise. Acrescente-se a isso que muitas células tumorais exibem uma superprodução de várias enzimas glicolíticas, entre elas uma isoenzima da hexoquinase que se associa com a face citosólica da membrana mitocondrial interna e é insensível à inibição retroativa ("feedback") pela glicose-6-fosfato (pág. 430). Essa enzima pode monopolizar o ATP produzido na mitocôndria e empregá-lo para converter glicose em glicose-6-fosfato, o que condena a célula à execução contínua da glicólise. As proteínas geradas por oncogenes e por genes supressores tumorais, tais como *p53* e *ras* (discutidos no Capítulo 13), estão envolvidas na produção aumentada das enzimas glicolíticas encontrada nas células tumorais.

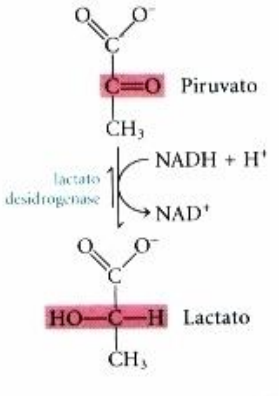
Destinos do Piruvato em Condições Aeróbicas e Anaeróbicas

O piruvato, produto da glicólise, representa um ponto de junção importante no catabolismo dos carboidratos (veja Fig. 15-3). Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado a acetato, o qual entra no ciclo do ácido cítrico e é oxidado até CO_2 e H_2O. O NADH formado pela desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato é reoxidado a NAD^+ pela passagem dos seus elétrons ao O_2 no processo da respiração mitocondrial. Entretanto, sob condições hipóxicas como em músculos esqueléticos muito ativos, em partes submersas de plantas, ou nas bactérias do ácido láctico, por exemplo, o NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo O_2. A incapacidade de regenerar o NADH em NAD^+ deixaria a célula sem receptor de elétrons para a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato e as reações liberadoras de energia da glicose cessariam. O NAD^+ precisa, portanto, ser regenerado por meio de outras reações.

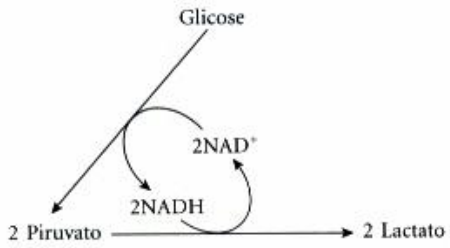
As primeiras células a surgirem durante a evolução viviam em uma atmosfera quase desprovida de oxigênio e tiveram que desenvolver estratégias para desenvolver a glicólise sob condições anaeróbicas. A maioria dos organismos modernos reteve a habilidade de regenerar continuamente o NAD^+ durante a glicólise anaeróbica pela transferência dos elétrons do NADH para formar um produto final reduzido, como o são o lactato e o etanol.

O piruvato é o receptor terminal de elétrons na fermentação do ácido láctico

Quando os tecidos animais não podem ser supridos com oxigênio suficiente para suportar a oxidação aeróbica do piruvato e do NADH produzidos na glicólise, o NAD^+ é regenerado a partir do NADH pela redução do piruvato a **lactato**. Outros tecidos e tipos celulares também produzem lactato da glicose, mesmo sob condições aeróbicas; o lactato é o grande produto do metabolismo da glicose no eritrócito. A redução do piruvato é catalisada pela **lactato desidrogenase**, que forma o isômero L do ácido láctico (lactato em pH 7). O equilíbrio global dessa reação favorece fortemente a formação de lactato, como fica evidenciado pela variação de energia livre padrão acentuadamente grande e negativa.



$\Delta G'^{\circ} = -25{,}1 kJ/mol$



Na glicólise, a desidrogenação de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, derivadas de cada molécula de glicose, converte duas moléculas de NAD^+ em duas de NADH. Como a redução de duas moléculas de piruvato em duas de lactato regenera duas moléculas de NAD^+, o processo global é equilibrado e pode continuar indefinidamente: uma molécula de glicose é convertida em duas de lactato, com a geração de duas moléculas de ATP e uma de glicose e, ainda, NAD^+ e NADH são continuamente interconvertidos sem nenhum ganho ou perda global na quantidade de cada um deles.

Embora existam dois passos de oxidação-redução quando a glicose é convertida em lactato, não há variação no estado de oxidação do carbono. Na glicose ($C_6H_{12}O_6$) e no ácido láctico ($C_3H_6O_3$), a relação H : C é a mesma. Não obstante, parte da energia da molécula de glicose foi extraída pela sua conversão em lactato; aliás, energia suficiente para dar uma produção líquida de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose consumida. O lactato formado por músculos ativos de animais vertebrados pode ser reciclado; ele é transportado pelo sangue até o fígado, onde é convertido em glicose, durante o período de recuperação da atividade muscular intensa. Quando o ácido láctico é produzido em grande quantidade durante contrações musculares vigorosas (por exemplo, durante uma corrida curta, mas feita em alta velocidade), a acidificação produzida pela ionização desse ácido nos músculos e no sangue provoca a sensação de dor e, assim, limita o tempo em que essas contrações podem ocorrer. Os atletas mais bem preparados não conseguem correr mais de um minuto nessas condições de esforço muscular extremo (Adendo 15-1).

Um grande número de microrganismos fermenta a glicose e outras hexoses até lactato. Certos lactobacilos e estreptococos, por exemplo, fermentam a lactose do leite em ácido láctico. A dissociação do ácido láctico em lactato e H^+ na mistura de fermentação faz baixar o pH, desnaturando a caseína e outras proteínas do leite e provocando sua precipitação. Sob condições adequadas e específicas, o processo de fermentação láctea produzirá queijo ou iogurte, dependendo de qual o tipo de microrganismo que está envolvido.

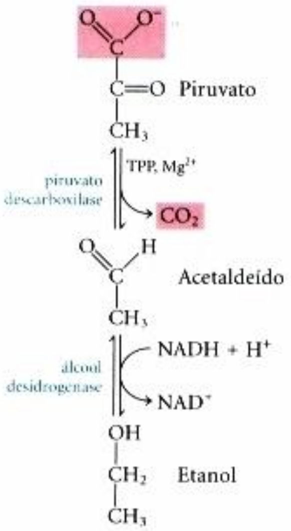
Na fermentação alcoólica o etanol é o produto final reduzido

A levedura e outros microrganismos fermentam a glicose em etanol e CO_2 e não em lactato. A glicose é convertida em piruvato pela glicólise, e o piruvato é convertido em etanol e CO_2 em um processo de dois passos. No primeiro passo, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela **piruvato descarboxilase**. Essa reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato descarboxilase requer Mg^{2+} e tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato, discutida mais detalhadamente adiante. No segundo passo, por ação da **álcool desidrogenase**, o acetaldeído é reduzido a etanol, com o NADH derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase fornecendo o poder redutor. Portanto, em vez de lactato, os produtos finais da fermentação alcoólica são o etanol e o CO_2. A equação geral da fermentação alcoólica é:

$$\text{Glicose} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\text{ etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Como na fermentação láctica não há variação líquida na relação do número de átomos de hidrogênio para os de carbono, quando a glicose (relação H : C = 12/6 = 2) é fermentada duas moléculas de etanol e duas de CO_2 (relação combinada H : C = 12/6 = 2). Em todas as fermentações, a relação H : C dos reagentes e dos produtos permanece a mesma.

A piruvato descarboxilase está caracteristicamente presente nas leveduras de cervejaria e padaria e em todos os outros organismos que promovem a fermentação alcoólica, incluindo algumas plantas. O CO_2 produzido na descarboxilação de piruvato pelas leveduras de cervejaria é o responsável pela carbonatação caraterística do champanhe. Além das reações da fermentação alcoólica, a arte milenar da fermentação da cerveja envolve, também, um grande número de outros processos enzimáticos (Adendo 15-2). Na panificação, quando a levedura é misturada com um açúcar fermentável, o CO_2 liberado pela piruvato carboxilase provoca o aumento de volume da massa panificada. Essa enzima está ausente nos tecidos de animais vertebrados e em outros organismos, como também está ausente nas bactérias do ácido láctico, que conduzem à fermentação láctica.



A álcool desidrogenase está presente em muitos organismos que metabolizam o álcool, incluindo o homem. No fígado humano, ela catalisa a *oxidação* do etanol, quer ele seja ingerido quer ele seja produzido por microrganismos intestinais, com a concomitante redução do NAD^+ para NADH.

A tiamina pirofosfato transporta grupos "aldeído ativos"

A reação da piruvato descarboxilase na fermentação alcoólica representa o nosso primeiro encontro com a **tiamina pirofosfato** (TPP) (Fig. 15-9), uma coenzima derivada da vitamina B_1. A ausência dessa vitamina na dieta humana leva a uma condição conhecida como beribéri, caracterizada por acúmulo de fluidos corporais (inchaço), dores, paralisias e, em última instância, morte.

A tiamina pirofosfato desempenha um importante papel na clivagem de ligações adjacentes a um grupo carbonila (como ocorre na descarboxilação dos α-cetoácidos) e nos rearranjos químicos envolvendo a transferência de um grupo aldeído ativado de um átomo de carbono para outro (Tabela 15-1). A parte funcional da tiamina pirofosfato é o anel tiazol (Fig. 15-9a). O próton em C-2 do anel é relativamente ácido e a perda desse próton ácido produz um carbânion que é a espécie ativa nas reações dependentes de TPP (Fig. 15-9c). Esse carbânion facilmente se adiciona a grupos carbonila e o anel tiazol é assim posicionado para agir como um "escoadouro de elétrons", que facilita fortemente as reações, como esta, de descarboxilação catalisada pela piruvato descarboxilase.

As fermentações microbianas liberam outros produtos finais com valor comercial

Embora o lactato e o etanol sejam os produtos comuns das fermentações microbianas, eles não são os únicos possíveis. Em 1910, Chaim Weizmann (posteriormente o primeiro presidente de Israel) descobriu que a bactéria *Clostridium acetobutyricum* fermenta o amido em butanol e acetona. Essa descoberta abriu o campo das fermentações industriais; nelas, alguns materiais ricos em carboidratos e de obtenção fácil e barata (amido de milho ou melaço, por exemplo) são fornecidos a uma cultura pura de um microrganismo específico, o qual fermenta a referida matéria-prima em um produto de grande valor comercial.

Adendo 15-1 Glicólise na presença de concentrações limitantes de oxigênio: atletas, jacarés e celacantos

Os vertebrados, em sua maioria, são organismos essencialmente aeróbicos que primeiro convertem a glicose em piruvato pela glicólise e, então, utilizando o oxigênio molecular, oxidam completamente o piruvato até CO_2 e H_2O. O catabolismo anaeróbico da glicose até ácido láctico ocorre durante períodos curtos de atividade muscular intensa, como por exemplo em uma corrida de 100m realizada em poucos segundos, durante os quais o oxigênio não pode ser levado aos músculos de forma suficientemente rápida para oxidar todo o piruvato. Assim, os músculos utilizam a glicose armazenada (glicogênio) como combustível para produzir ATP por meio da fermentação, com a produção de lactato como produto final. Dessa forma, em uma corrida rápida, a concentração de lactato no sangue sobe a valores muito altos. Esse lactato é reconvertido lentamente em glicose pelo fígado, por meio do processo de gliconeogênese (Capítulo 19), durante o período de repouso subseqüente, quando o organismo se recupera e o oxigênio é consumido de forma gradualmente decrescente até que o ritmo respiratório volte ao normal. O excesso de oxigênio consumido durante o período de recuperação representa a reposição do débito de oxigênio, que é a quantidade de oxigênio necessária para suprir ATP suficiente para regenerar o glicogênio muscular e hepático, consumido na execução da intensa atividade muscular durante a corrida. O ciclo de reações que inclui a transformação da glicose em lactato no músculo e a reconversão deste em glicose no fígado é chamado de ciclo de Cori. O nome provém do casal, Carl Cori e Gerty Cori, que, nas décadas de 1930 e 1940, estudou e esclareceu essa via e o seu papel no metabolismo.

De maneira geral, o sistema circulatório da maioria dos vertebrados pequenos pode transportar oxigênio aos músculos de maneira suficientemente rápida para evitar o consumo anaeróbico do glicogênio muscular. Por exemplo, os pássaros migradores freqüentemente voam grandes distâncias em alta velocidade, sem descanso e sem entrar em débito de oxigênio. Muitos animais de porte moderado, capazes de corridas muito longas, têm metabolismo essencialmente aeróbico em seus músculos esqueléticos. Entretanto, nos animais de porte relativamente grande, inclusive no homem, o sistema circulatório não consegue sustentar completamente o metabolismo aeróbico de seus músculos esqueléticos durante um período de atividade intensa. Tais animais, geralmente, movem-se lentamente sob circunstâncias normais e desenvolvem atividade muscular intensa apenas diante de emergências muito graves, isso porque tal tipo de atividade requer um período de recuperação muito longo para a reposição do débito de oxigênio.

Os crocodilos e os jacarés, por exemplo, são normalmente lentos e letárgicos. Entretanto, quando provocados, esses animais são capazes de atacar com a rapidez de um relâmpago e de desferir perigosos golpes com suas caudas poderosas. Essas explosões de atividade muscular intensa são curtas e precisam ser seguidas por longos períodos de recuperação. Durante a atividade muscular intensa, os estoques de glicogênio são consumidos de maneira rápida e o lactato atinge concentrações muito altas nos músculos e nos fluidos extracelulares. Enquanto um atleta treinado pode se recuperar de uma corrida de 100m em 30min ou menos; um crocodilo, entretanto, após a explosão de atividade, pode necessitar de várias horas de repouso e consumo extra de oxigênio para retirar o excesso de ácido láctico do seu sangue e regenerar o glicogênio muscular.

Outros animais de grande porte, como o elefante e o rinoceronte, têm problemas metabólicos semelhantes, o que também ocorre com os mamíferos aquáticos que mergulham a grandes profundidades, como as baleias e as focas. Os dinossauros e outros animais pré-históricos de grande porte dependiam, provavelmente, da glicólise anaeróbica para obter a energia muscular necessária para suas atividades, as quais deviam ser seguidas por longos períodos de recuperação, durante os quais ficavam vulneráveis ao ataque de pequenos animais predadores, mais hábeis no emprego do oxigênio e mais adaptados à atividade muscular contínua e prolongada.

A exploração do fundo do mar tem revelado muitas espécies de vida marinha que sobrevivem a grandes profundidades, onde a concentração de oxigênio está próxima de zero. Por exemplo, o celacanto, um peixe primitivo encontrado por pescadores das costas da África do Sul a profundidades maiores que 4.000m, é um peixe grande com metabolismo essencialmente anaeróbico em praticamente todos os seus tecidos, o qual converte os carboidratos em lactato e outros produtos; a maioria desses produtos precisa ser excretada. Curiosamente, alguns vertebrados marinhos fermentam a glicose até etanol e CO_2 quando precisam obter energia na forma de ATP.

Adendo 15-2 A fabricação da cerveja

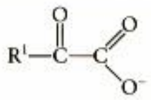
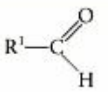
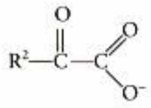
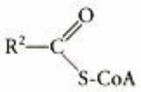
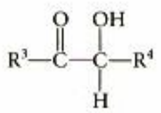
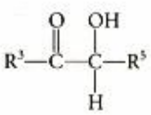
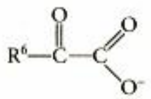
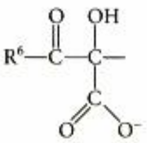
A cerveja é fabricada por fermentação alcoólica dos carboidratos presentes nos grãos de cereais (sementes) como a cevada, mas esses carboidratos, principalmente polissacarídeos, não são atacados pelas enzimas da via glicolítica das células da levedura, as quais podem trabalhar apenas com monossacarídeos e dissacarídeos. A cevada precisa sofrer primeiro um processo chamado de maltagem. As sementes do cereal são deixadas germinar até formarem as enzimas apropriadas necessárias à hidrólise dos polissacarídeos da parede celular das sementes, bem como do amido e outros polissacarídeos da reserva alimentar. A germinação é, então, detida por aquecimento controlado, o que impede a semente de continuar a crescer. O produto desse processo é o malte, o qual contém as enzimas amilase e maltase capazes de hidrolisar o amido até maltose, glicose e outros açúcares simples. O malte também contém enzimas específicas para as ligações β da celulose e outros polissacarídeos das paredes celulares das sementes da cevada, que precisam ser quebradas para permitir a ação da α-amilase sobre o amido contido no interior dos grãos.

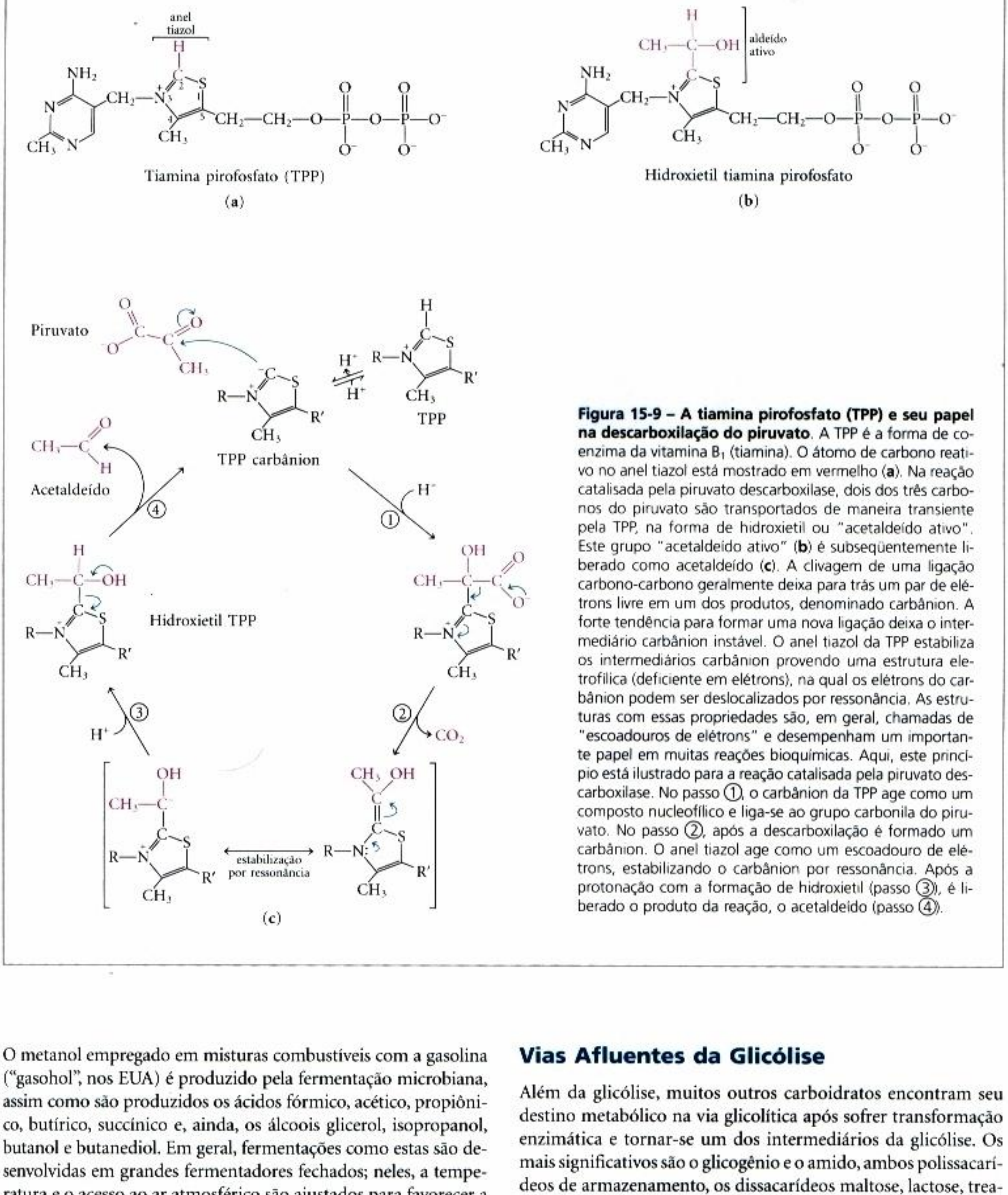
No passo seguinte, o cervejeiro prepara o mosto, o meio nutriente necessário à fermentação subseqüente a ser realizada pelas células da levedura. O malte é misturado com água e macerado. Isso permite que as enzimas formadas durante a preparação do malte exerçam sua atividade sobre os polissacarídeos do cereal e produzam maltose, glicose e outros açúcares simples, que são solúveis no meio aquoso. O material celular restante é separado e o mosto líquido é fervido com lúpulo para aromatizá-lo. Então, o mosto é resfriado e aerado.

Agora as células da levedura são adicionadas. No mosto aeróbico, a levedura se reproduz muito rapidamente, empregando a energia obtida pela metabolização de parte dos açúcares existentes no meio. Nessa fase não ocorre a formação de álcool, pois a levedura, tendo muito oxigênio à disposição, oxida o piruvato formado pela glicólise no ciclo do ácido cítrico até CO_2 e H_2O. Quando todo o oxigênio dissolvido existente no tanque de fermentação for consumido, as células da levedura passam a utilizar anaerobicamente o açúcar existente no mosto. A partir desse ponto, a levedura fermenta esses açúcares em etanol e dióxido de carbono. O processo de fermentação é controlado, em parte, pela concentração de etanol que se forma, pelo pH do meio e pela quantidade de açúcar remanescente. Após a interrupção da fermentação, as células são removidas e a cerveja bruta está pronta para ser submetida ao processamento final.

Nos passos finais da fabricação da cerveja, é realizado o controle da espuma, ou "colarinho", o qual é provocado por proteínas dissolvidas. Normalmente esse controle é feito pelo emprego de enzimas proteolíticas que aparecem no preparo do malte. Caso elas atuem durante um tempo prolongado sobre as proteínas da cerveja, esta produzirá pouca espuma, e se esse tempo de atuação for muito curto a cerveja ficará turva quando gelada. Algumas vezes, enzimas proteolíticas de outras fontes são adicionadas para controlar a espuma.

Tabela 15-1 – Algumas reações dependentes da tiamina pirofosfato (TPP)

Enzima	Via	Ligação clivada	Ligação formada
Piruvato descarboxilase	Fermentação alcoólica		
Piruvato desidrogenase α-Cetoglutarato desidrogenase	Síntese do acetil-CoA Ciclo do ácido cítrico		
Transcetolase	Reações de fixação do carbono na fotossíntese		
Acetolactato sintetase	Biossíntese da valina e da leucina		



Tiamina pirofosfato (TPP)
(a)

Hidroxietil tiamina pirofosfato
(b)

(c)

Figura 15-9 – A tiamina pirofosfato (TPP) e seu papel na descarboxilação do piruvato. A TPP é a forma de coenzima da vitamina B_1 (tiamina). O átomo de carbono reativo no anel tiazol está mostrado em vermelho (**a**). Na reação catalisada pela piruvato descarboxilase, dois dos três carbonos do piruvato são transportados de maneira transiente pela TPP, na forma de hidroxietil ou "acetaldeído ativo". Este grupo "acetaldeído ativo" (**b**) é subseqüentemente liberado como acetaldeído (**c**). A clivagem de uma ligação carbono-carbono geralmente deixa para trás um par de elétrons livre em um dos produtos, denominado carbânion. A forte tendência para formar uma nova ligação deixa o intermediário carbânion instável. O anel tiazol da TPP estabiliza os intermediários carbânion provendo uma estrutura eletrofílica (deficiente em elétrons), na qual os elétrons do carbânion podem ser deslocalizados por ressonância. As estruturas com essas propriedades são, em geral, chamadas de "escoadouros de elétrons" e desempenham um importante papel em muitas reações bioquímicas. Aqui, este princípio está ilustrado para a reação catalisada pela piruvato descarboxilase. No passo ①, o carbânion da TPP age como um composto nucleofílico e liga-se ao grupo carbonila do piruvato. No passo ②, após a descarboxilação é formado um carbânion. O anel tiazol age como um escoadouro de elétrons, estabilizando o carbânion por ressonância. Após a protonação com a formação de hidroxietil (passo ③), é liberado o produto da reação, o acetaldeído (passo ④).

O metanol empregado em misturas combustíveis com a gasolina ("gasohol", nos EUA) é produzido pela fermentação microbiana, assim como são produzidos os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, succínico e, ainda, os álcoois glicerol, isopropanol, butanol e butanediol. Em geral, fermentações como estas são desenvolvidas em grandes fermentadores fechados; neles, a temperatura e o acesso ao ar atmosférico são ajustados para favorecer a multiplicação do microrganismo desejado e excluir organismos contaminantes (Fig. 15-10). A beleza das fermentações industriais está no fato de transformações químicas complexas, com muitos passos, serem realizadas com grande rendimento e aparecimento de pouquíssimos produtos colaterais, por fábricas químicas que se auto-reproduzem — as células microbianas! Em alguns casos é possível imobilizar as células em um suporte inerte, passar continuamente o material inicial através desse leito de células imobilizadas e coletar o produto desejado no efluente. O sonho dos engenheiros químicos!

Vias Afluentes da Glicólise

Além da glicólise, muitos outros carboidratos encontram seu destino metabólico na via glicolítica após sofrer transformação enzimática e tornar-se um dos intermediários da glicólise. Os mais significativos são o **glicogênio** e o amido, ambos polissacarídeos de armazenamento, os dissacarídeos maltose, lactose, trealose e sacarose, e os monossacarídeos frutose, manose e galactose (Fig. 15-11).

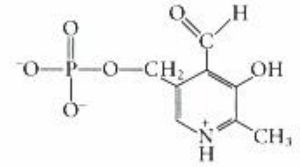
O glicogênio e o amido são degradados por fosforólise

As unidades de glicose dos ramos externos da molécula do glicogênio e do amido ganham entrada na via glicolítica por ação seqüencial de duas enzimas: a fosforilase do glicogênio (ou da sua similar nos vegetais, a fosforilase do amido) e a fosfoglicomutase. A fosforilase do glicogênio catalisa a reação em que uma

Figura 15-10 – Uma fermentação em escala industrial. Os microrganismos são cultivados em um grande vaso esterilizável contendo milhares de litros de caldo de crescimento, elaborado, basicamente, com uma substância que é fonte barata de carbono e energia. As condições são cuidadosamente controladas e incluem baixa concentração de oxigênio e temperatura constante. As células da levedura são separadas do meio de crescimento por centrifugação e os produtos da fermentação de valor comercial são recuperados das células ou do líquido sobrenadante.

ligação glicosídica ($\alpha1\rightarrow4$), reunindo dois resíduos de glicose no glicogênio, sofre o ataque por fosfato inorgânico, removendo o resíduo terminal de glicose como **α-D-glicose-1-fosfato** (Fig. 15-12). Essa reação de *fosforólise*, que ocorre durante a mobilização intracelular do glicogênio armazenado, é diferente da *hidrólise* das ligações glicosídicas pela amilase, que ocorre durante a degradação intestinal do amido ou do glicogênio; na fosforólise, parte da energia da ligação glicosídica é preservada na formação do éster fosfórico, glicose-1-fosfato.

O piridoxal fosfato é um co-fator essencial da reação da fosforilase do glicogênio; o seu grupo fosfato age como um catalisador ácido geral, promovendo o ataque pelo P_i da ligação glicosídica. (Um papel muito diferente do piridoxal fosfato como um co-fator no metabolismo dos aminoácidos será descrito em detalhes no Capítulo 18.)



Piridoxal fosfato

A fosforilase do glicogênio (como também a fosforilase do amido) age repetitivamente nas extremidades não-redutoras das ramificações do glicogênio (ou da amilopectina), até que seja atingido, num ponto distante, quatro resíduos de uma ramifi-

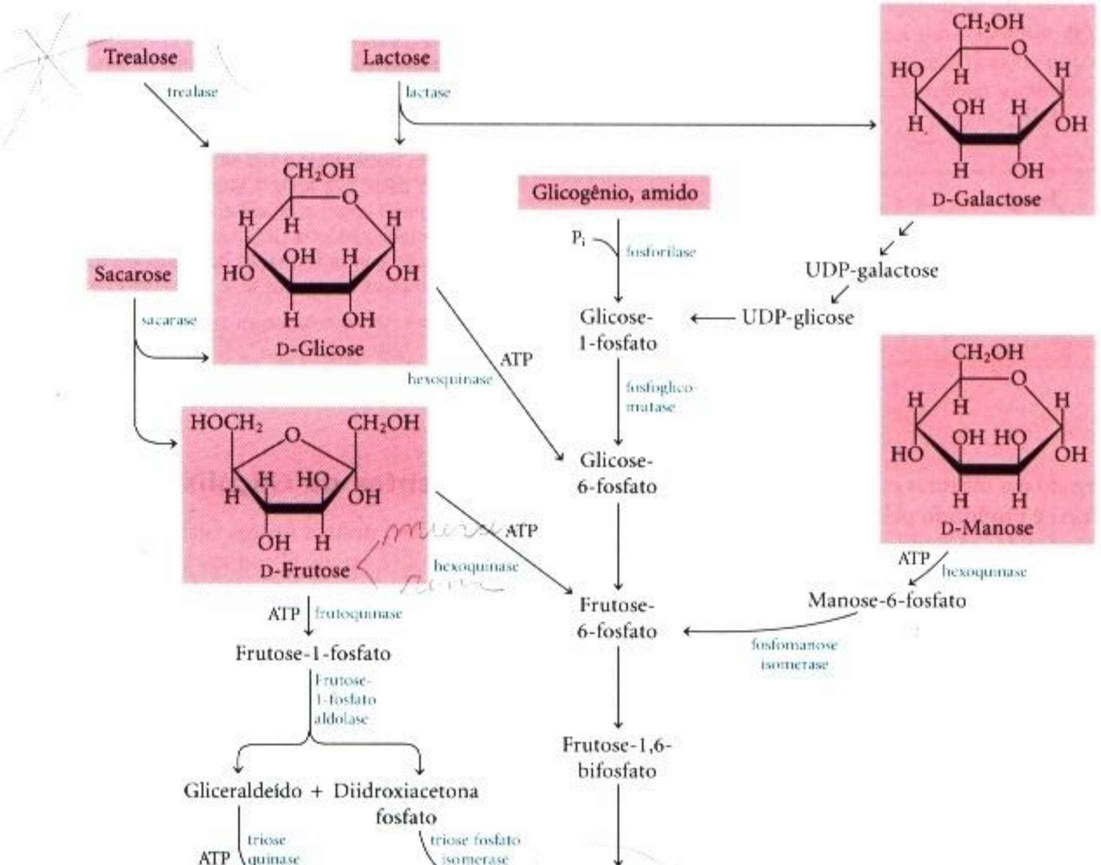

Trealose
trealase
Lactose
lactase
D-Galactose
D-Glicose
Glicogênio, amido
P_i
fosforilase
UDP-galactose
Sacarose
sacarase
Glicose-1-fosfato
UDP-glicose
ATP
hexoquinase
fosfoglicomutase
D-Manose
Glicose-6-fosfato
D-Frutose
ATP
hexoquinase
ATP
hexoquinase
ATP
frutoquinase
Frutose-6-fosfato
Manose-6-fosfato
fosfomanose isomerase
Frutose-1-fosfato
Frutose-1-fosfato aldolase
Frutose-1,6-bifosfato
Gliceraldeído + Diidroxiacetona fosfato
ATP
triose quinase
triose fosfato isomerase
Gliceraldeído-3-fosfato

Figura 15-11 – **Formas de entrada do glicogênio, do amido, dos dissacarídeos e das hexoses na fase de preparação da glicólise**.

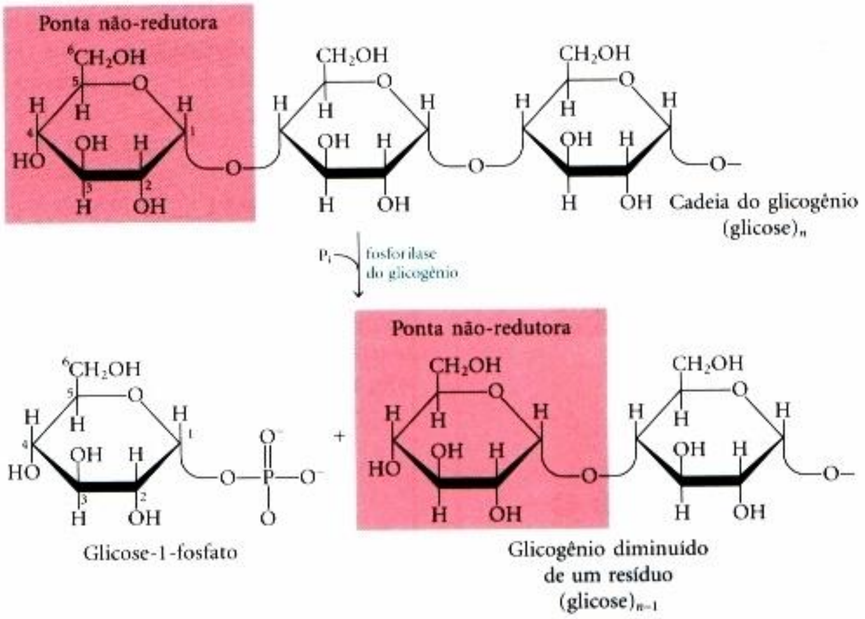


Figura 15-12 – Remoção de um resíduo terminal de glicose da ponta não-redutora da cadeia do glicogênio pela ação da fosforilase do glicogênio. Esse processo é repetitivo, removendo, sucessivamente, os resíduos de glicose até ser atingida a quarta unidade de glicose contada a partir de um ponto de ramificação (veja Fig. 15-13). A amilopectina é degradada de uma forma similar pela fosforilase do amido.

cação (α1→6) (veja Fig. 9-15). Aqui cessa a ação da fosforilase do glicogênio ou do amido. A continuação da degradação pode ocorrer apenas depois da ação de uma "**enzima de desramificação**" ou **oligo (α1→6) para (α1→4) glicanotransferase**, que catalisa as duas reações sucessivas que removem as ramificações (Fig. 15-13).

A glicose-1-fosfato, o produto final das reações de fosforilase do glicogênio e do amido, é convertida em glicose-6-fosfato pela **fosfoglicomutase**, que catalisa a reação reversível

$$\text{Glicose-1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose-6-fosfato}$$

A fosfoglicomutase requer como co-fator a **glicose-1,6-bifosfato**; o seu papel é análogo àquele do 2,3-bifosfoglicerato na reação catalisada pela fosfogliceratomutase (veja Fig. 15-6). A fosfoglicomutase, como a fosfogliceratomutase, recicla entre as formas fosforiladas e não-fosforiladas. Entretanto, no ciclo catalítico da fosfoglicomutase é um grupo hidroxila de serina, presente no sítio ativo, que é transitoriamente fosforilado (enquanto na fosfogliceratomutase o resíduo de aminoácido participante é o da histidina).

Outros monossacarídeos entram na via glicolítica em vários pontos

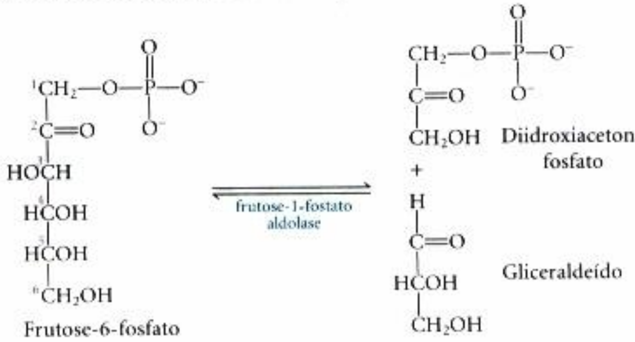
Na maioria dos organismos, várias hexoses diferentes da glicose podem sofrer a glicólise, após suas respectivas conversões para um derivado fosforilado. A D-frutose, presente em muitas frutas na forma livre e formada pela hidrólise da sacarose no intestino delgado, pode ser fosforilada pela hexoquinase, que age em várias hexoses diferentes:

$$\text{Frutose + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{frutose-6-fosfato + ADP}$$

Essa é uma via importante nos músculos e rins dos vertebrados. No fígado, entretanto, a frutose entra na glicólise por uma via diferente. A enzima hepática **frutoquinase** catalisa a fosforilação da frutose, não em C-6, mas em C-1:

$$\text{Frutose + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{frutose-1-fosfato + ADP}$$

A frutose-1-fosfato é então quebrada ao meio para formar gliceraldeído e diidroxiacetona fosfato pela **frutose-1-fosfato aldolase**:



A diidroxiacetona fosfato é convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima glicolítica triose fosfato isomerase. O gliceraldeído é fosforilado pelo ATP a gliceraldeído-3-fosfato pela ação da **triose quinase**:

$$\text{Gliceraldeído + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{gliceraldeído-3-fosfato + ADP}$$

Assim, os dois produtos da hidrólise da frutose entram na via glicolítica como gliceraldeído-3-fosfato.

A D-galactose, derivada por hidrólise do dissacarídeo lactose (açúcar do leite), é primeiro fosforilada pelo ATP em C-1 por meio da enzima **galactoquinase**:

$$\text{Galactose + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{galactose-1-fosfato + ADP}$$

A galactose-1-fosfato é convertida, então, no seu epímero em C-4, a glicose-1-fosfato, por um conjunto de reações nas quais a **uridina difosfato** (UDP) funciona de forma semelhante a uma coenzima como transportadora de moléculas de hexoses (Fig. 15-14).

Existem várias doenças genéticas humanas nas quais o metabolismo da galactose está afetado. Na forma mais comum de **galactosemia**, a enzima UDP-glicose: galactose-1-fosfato uridiltransferase é geneticamente defeituosa, impedindo a conversão global da galactose em glicose. Outras formas de galactosemia resultam quando ou a galactoquinase ou a UDP-glicose-4-epimerase é geneticamente defeituosa.

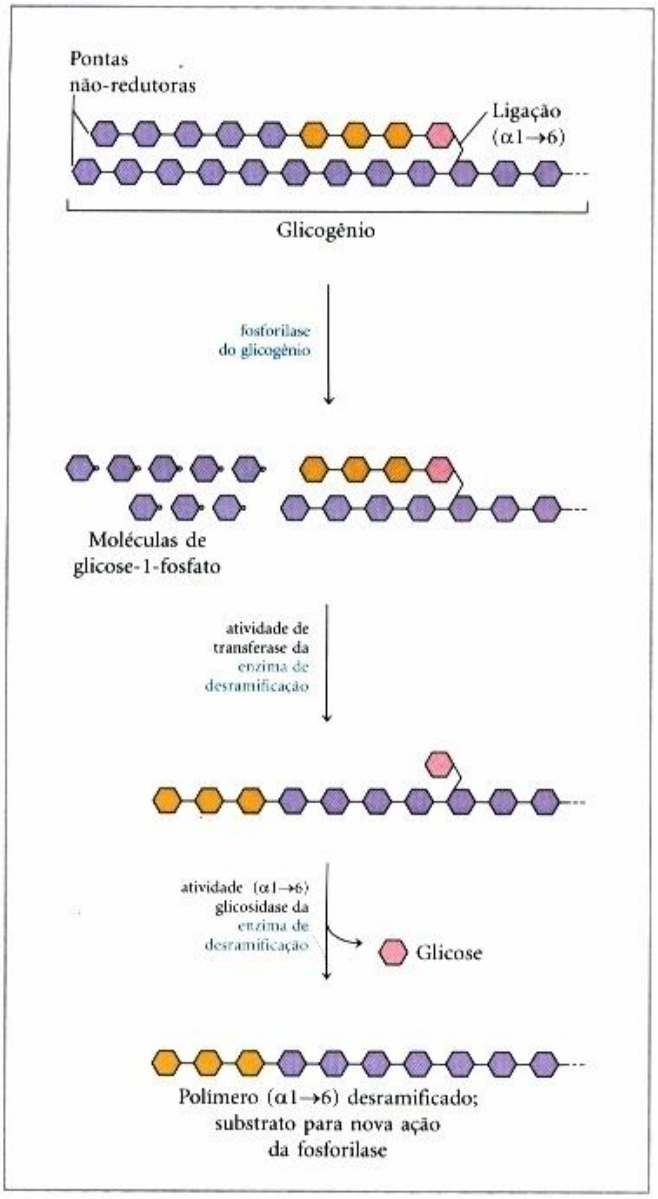

Pontas
não-redutoras
Ligação
(α1→6)
Glicogênio
fosforilase
do glicogênio
Moléculas de
glicose-1-fosfato
atividade de
transferase da
enzima de
desramificação
atividade (α1→6)
glicosidase da
enzima de
desramificação
Glicose
Polímero (α1→6) desramificado;
substrato para nova ação
da fosforilase

Figura 15-13 – Quebra do glicogênio próximo a um ponto de ramificação (α1→6). Em seguida à remoção seqüencial de resíduos terminais de glicose pela fosforilase do glicogênio (veja Fig. 15-12), os resíduos de glicose próximos do ponto de ramificação são removidos por um processo em duas etapas, que necessita de uma enzima bifuncional: a enzima de desramificação. Primeiro, a atividade de transferase da enzima muda um bloco de três resíduos de glicose do ponto de ramificação para uma ponta não-redutora próxima, e aí são presos por uma ligação (α1→4). O único resíduo de glicose que permanece no ponto de ramificação unido por ligação (α1→6) é, agora, liberado como glicose pela atividade desramificadora (α1→6) glicosidase. Nesta figura, os resíduos de glicose são mostrados em forma simplificada.

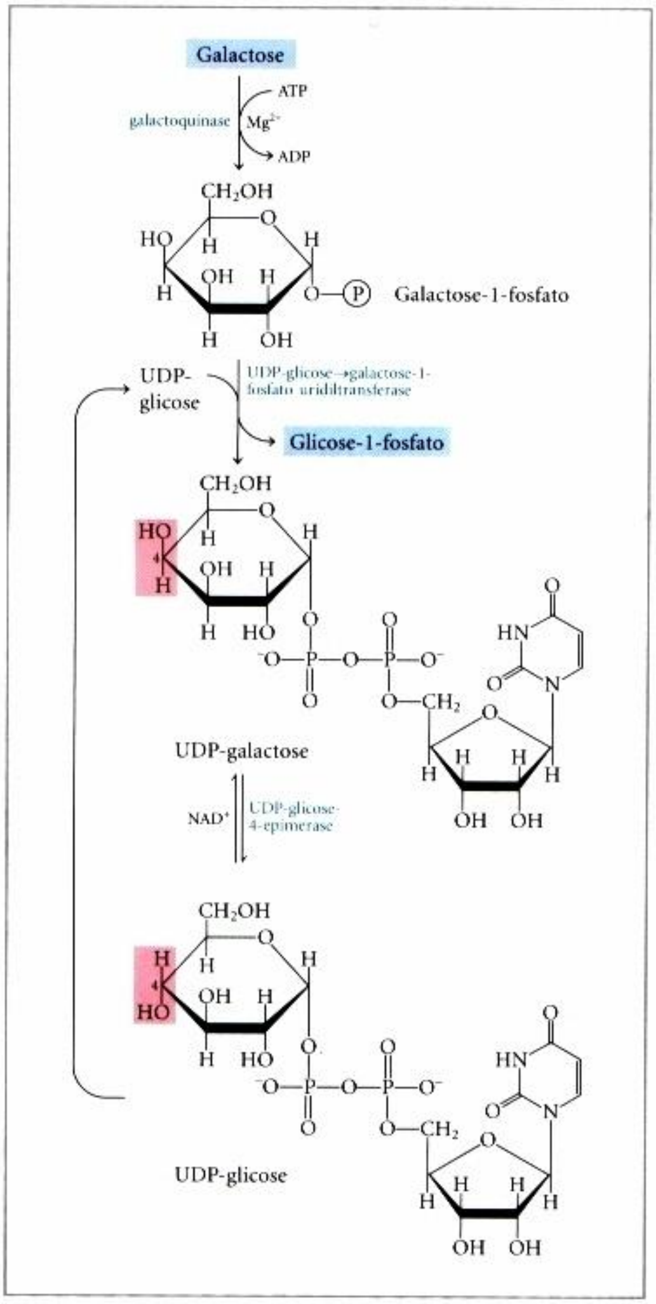

Galactose
ATP
galactoquinase
Mg²⁺
ADP
CH₂OH
Galactose-1-fosfato
UDP-
glicose
UDP-glicose→galactose-1-fosfato uridiltransferase
Glicose-1-fosfato
UDP-galactose
NAD⁺
UDP-glicose-4-epimerase
UDP-glicose

Figura 15-14 – Via de conversão da D-galactose-1-fosfato em D-glicose-1-fosfato. A conversão ocorre por meio de um derivado açúcar-nucleotídeo, UDP-galactose, que é formado quando galactose-1-fosfato desloca a glicose-1-fosfato da UDP-glicose. A UDP-galactose é então convertida em UDP-glicose pela UDP-glicose-4-epimerase. A UDP-glicose é regenerada por meio de um novo ciclo das mesmas reações. O efeito líquido desse ciclo é a conversão da galactose-1-fosfato em glicose-1-fosfato; não há nem produção nem consumo líquido final de UDP-galactose ou UDP-glicose.

A **D-manose**, que surge da digestão de vários polissacarídeos e de glicoproteínas presentes na alimentação, pode ser fosforilada em C-6 pela hexoquinase:

$$\text{Manose} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{manose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

A seguir a manose-6-fosfato é isomerizada pela ação da **fosfomanose isomerase**, para liberar a frutose-6-fosfato, um intermediário da glicólise.

Os polissacarídeos e os dissacarídeos ingeridos na alimentação são hidrolisados em monossacarídeos

Para muitos seres humanos, o amido é a fonte principal de carboidratos. Sua digestão começa na boca, onde a **α-amilase** salivar hidrolisa as ligações glicosídicas internas produzindo fragmentos polissacarídicos pequenos denominados **oligossacarídeos**. No estômago, a amilase salivar é inativada pelo pH fortemente ácido, mas uma segunda α-amilase, secretada pelo pâncreas no duodeno, continua o processo de hidrólise do amido. A ação da amilase pancreática produz principalmente: maltose (o dissacarídeo formado por $\alpha(1\rightarrow4)$ glicose) e oligossacarídeos chamados dextrinas; estas são fragmentos da amilopectina contendo os pontos de ramificação $\alpha(1\rightarrow6)$. A maltose e as dextrinas são degradadas por enzimas do epitélio intestinal "em escova" (as microvilosidades assemelhadas a dedos recobertas pelas células epiteliais do intestino e que aumentam muito sua área de superfície). O glicogênio ingerido tem, em essência, a mesma estrutura da amilopectina e sua digestão ocorre na mesma forma.

Os dissacarídeos precisam ser hidrolisados em monossacarídeos antes de penetrar nas células. Os dissacarídeos intestinais e as dextrinas precisam ser primeiro hidrolisados pelas enzimas localizadas na superfície externa das células epiteliais que recobrem o intestino delgado.

$$\text{Dextrina} + n\text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{dextrinase}]{} n\ \text{D-glicose}$$

$$\text{Maltose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{maltase}]{} 2\ \text{D-glicose}$$

$$\text{Lactose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{lactase}]{} \text{D-galactose} + \text{D-glicose}$$

$$\text{Sacarose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{sacarase}]{} \text{D-frutose} + \text{D-glicose}$$

$$\text{Trealose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{trealase}]{} 2\ \text{D-glicose}$$

Assim formados, os monossacarídeos são transportados para o interior das células epiteliais e, a partir delas, eles passam para a corrente sangüínea, sendo então transportados até os diferentes tecidos onde são fosforilados e introduzidos na seqüência glicolítica.

A **intolerância à lactose** é uma condição comum entre adultos da maioria das raças humanas, com exceção das originadas no norte europeu e algumas africanas, e é causada pelo desaparecimento, depois da infância, da maior parte ou de toda atividade de lactase das células intestinais (Fig. 15-15). Dessa forma, a lactose não pode ser digerida e absorvida completamente no intestino delgado e é convertida pelas bactérias presentes no intestino grosso em produtos tóxicos que causam dores abdominais e diarréia. Nas partes do mundo onde a intolerância à lactose tem incidência muito alta, o leite não é ingerido como alimento pelos adultos, embora derivados do leite pré-digeridos com lactase sejam oferecidos comercialmente. Em algumas doenças humanas, várias, ou mesmo todas, dissacaridases intestinais estão ausentes. Nesses casos, os distúrbios digestivos provocados pela ingestão de dissacarídeos podem ser minimizados por medidas dietéticas.

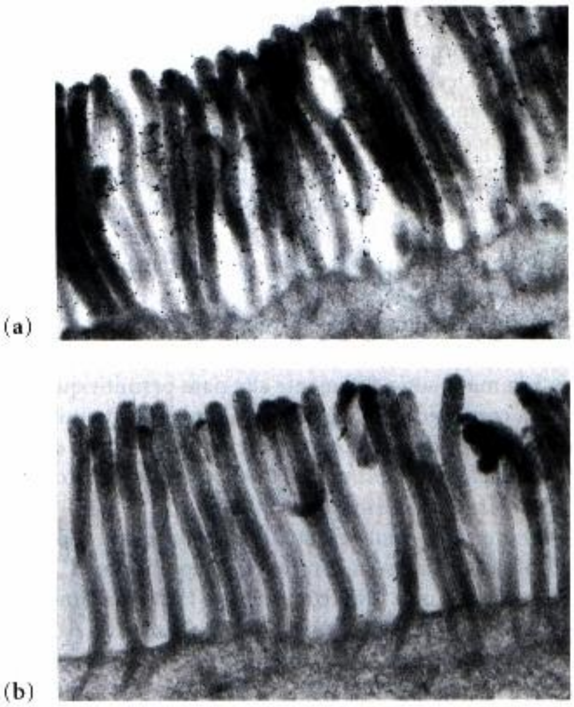


Figura 15-15 – Atividade de lactase nas células epiteliais do intestino. Apesar de todas as crianças possuírem a lactase intestinal, muitas pessoas cessam de produzi-la quando chegam à idade adulta e, por isso, passam a ser intolerantes à lactose. A enzima lactase, uma dissacaridase do epitélio intestinal, pode ser detectada pelo tratamento de uma fina secção do tecido intestinal com um anticorpo que se liga especificamente à enzima. Os anticorpos são visualizados ao microscópio eletrônico pela ligação, a eles, de partículas coloidais de ouro; estas são eletronicamente densas e aparecem como pontos negros nas eletromicrofotografias. **(a)** O tecido de um adulto cujo intestino reteve altos níveis de lactase. As microvilosidades estão fortemente marcadas pelos anticorpos que detectam a lactase. **(b)** As microvilosidades intestinais de um indivíduo adulto, com intolerância à lactose, são muito menos marcadas com os anticorpos contra a lactase.

Regulação do Catabolismo dos Carboidratos

O catabolismo dos carboidratos fornece ATP e uma variedade de precursores para diferentes processos biossintéticos. É crucial para a célula manter uma concentração suficiente de ATP em nível quase constante, independentemente de quanto combustível é empregado para produzir esse ATP e independentemente da velocidade com que ele é consumido. Da mesma forma, os precursores biossintéticos derivados do catabolismo dos carboidratos (por exemplo, a frutose-6-fosfato para a síntese da glicosamina ou o 3-fosfoglicerato para a biossíntese de aminoácidos) devem ser fornecidos em quantidades adequadas. Um organismo que sofre uma variação nas circunstâncias em que vive, como durante um período de atividade muscular aumentada, uma disponibilidade diminuída de oxigênio, ou ingestão alimentar diminuída de carboidrato, precisa alterar seus padrões catabólicos para mudar o fluxo de combustível e, possivelmente, a fonte desse combustível, mobilizando as fontes de reserva destinada ao uso em tempos de necessidade. Essas mudanças nos padrões catabólicos são realizadas pela regulação de enzimas-chave nas vias catabólicas. Na glicólise do músculo e do tecido hepático, quatro enzimas desempenham papéis reguladores: a fosforilase do glicogênio, a hexoquinase, a fosfofrutoquinase-1 e a piruvato quinase. Discutir a regulação da glicólise envolve, necessariamente, alguns detalhes do processo recíproco e também regulado da síntese da glicólise (gliconeogênese), a qual será amplamente discutida no Capítulo 20.

Antes de descrever a regulação do catabolismo da glicose, vamos considerar alguns princípios que se aplicam à regulação de todas as vias bioquímicas.

As enzimas reguladoras agem como válvulas metabólicas

Os organismos adultos, embora não estejam em equilíbrio com o meio ambiente, passam a maior parte do tempo em um estado estacionário. A ingestão constante de combustíveis e outros nutrientes e a liberação contínua de energia e produtos de degradação permitem ao organismo manter uma composição constante. Quando o estado estacionário é perturbado por variações nas circunstâncias externas ou de suprimento de combustível, os fluxos temporariamente alterados pelas vias metabólicas individuais disparam mecanismos reguladores intrínsecos a cada uma dessas vias. O efeito final de todos esses ajustes é fazer o organismo retornar ao estado estacionário, ou seja, conseguir a **homeostase**. Devido ao papel central do ATP nas atividades celulares, a evolução produziu enzimas catabólicas com propriedades reguladoras que asseguram uma alta concentração de ATP no estado estacionário (o termo "alta" deve, neste contexto, ser entendido em relação às concentrações dos produtos da quebra do ATP, ou seja, do ADP e do AMP).

O fluxo através de uma via bioquímica depende das atividades das enzimas que catalisam cada reação. Para algumas das enzimas em uma via como a glicólise, a reação que catalisa está essencialmente em equilíbrio no interior da célula; a atividade de tais enzimas é suficientemente alta para permitir que o substrato seja convertido em produto tão rapidamente quanto esse substrato é suprido. O fluxo por meio desse passo é essencialmente *limitado pelo substrato* — é determinado pela concentração instantânea do substrato.

Outras reações celulares estão muito longe do equilíbrio. Na via glicolítica, o valor da constante de equilíbrio (K'_{eq}) para a reação catalisada pela fosfofrutoquinase-1 está próximo de 250, porém a relação das massas [frutose-1,6-bifosfato][ADP]/[frutose-6-fosfato][ATP] em uma célula típica no estado estacionário é, aproximadamente, 0,04 (as concentrações intracelulares de algumas enzimas e reagentes glicolíticos são apresentadas na Tabela 15-2). A reação está tão longe do equilíbrio porque a velocidade de conversão da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato é limitada pela atividade de PFK-1. A produção aumentada de frutose-6-fosfato pelas enzimas precedentes na via glicolítica não aumenta o fluxo por meio desse passo e leva, assim, ao acúmulo do substrato, a frutose-6-fosfato. Assim a PFK-1 funciona como uma válvula, regulando o fluxo de carbono por meio da glicólise; aumentando a atividade dessa enzima (por ativação alostérica, por exemplo), aumenta o fluxo global através da via. O fluxo metabólico através dessa via é determinado não pela lei da ação das massas (pelas concentrações de substrato e produto), mas pela "abertura" dessa válvula.

Em todas as vias metabólicas há pelo menos uma reação que, na célula, devido à atividade relativamente baixa da enzima que a catalisa, está muito distante do equilíbrio (Fig. 15-16). A velocidade dessa reação não é limitada pela disponibilidade do substrato, mas apenas pela atividade da enzima. Diz-se que essa reação é *enzimaticamente limitada*, e, porque sua velocidade limita a velocidade de toda a seqüência de reações, o passo é chamado

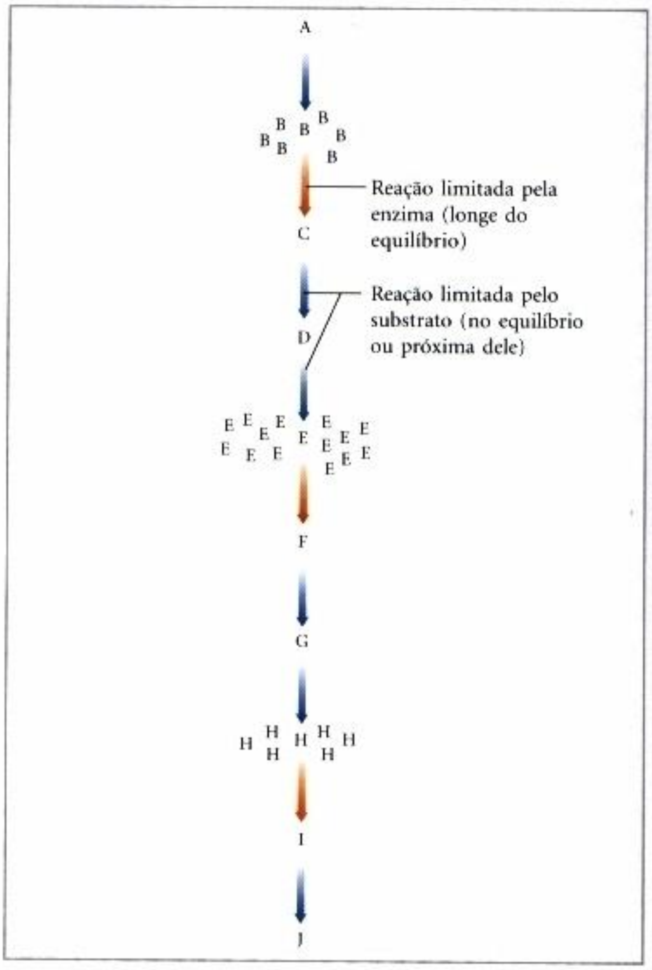

A
B B B B
B B B
Reação limitada pela enzima (longe do equilíbrio)
C
Reação limitada pelo substrato (no equilíbrio ou próxima dele)
D
E E E E E E E E
E E E E E E E
F
G
H H H H H
H H
I
J

Figura 15-16 – A regulação do fluxo em vias de muitos passos. Esta regulação ocorre nos passos cuja velocidade é enzimaticamente limitada. Cada um desses passos (setas alaranjadas) é, em geral, exergônico, e neles o substrato não está em equilíbrio com o produto porque a reação catalisada enzimaticamente é relativamente lenta. O substrato para essas reações tende a acumular-se, assim como a água de um rio acumula-se atrás de uma represa. O mais lento desses passos limitados enzimaticamente é o passo que limita a velocidade do processo total. As reações situadas entre passos limitados enzimaticamente são mais rápidas e em cada uma delas (setas azuis) o substrato e o produto estão essencialmente nas suas concentrações de equilíbrio; estas reações são limitadas pelo substrato. No estado estacionário, todas as reações na seqüência ocorrem na mesma velocidade e esta é determinada pelo passo limitante da velocidade.

Tabela 15-2 – Concentrações citosólicas de enzimas e intermediários da via glicolítica no músculo esquelético

Enzima	Concentração (μM)	Intermediário	Concentração (μM)
Aldolase	810	Glicose-6-fosfato	3.900
Triose fosfato isomerase	220	Frutose-6-fosfato	1.500
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1.400	Frutose-1,6-bifosfato	80
Fosfoglicerato quinase	130	Diidroxiacetona fosfato	160
Fosfoglicerato mutase	240	Gliceraldeído-3-fosfato	80
Enolase	540	1,3-Bifosfoglicerato	50
Piruvato quinase	170	3-Fosfoglicerato	200
Lactato desidrogenase	300	2-Fosfoglicerato	20
Fosfoglicomutase	32	Fosfoenolpiruvato	65
		Piruvato	380
		Lactato	3.700
		ATP	8.000
		ADP	600
		P_i	8.000
		NAD^+	540
		NADH	50

Fonte: Srivastava DK & Bernhard SA. (1987) Biophysical chemistry of metabolic reaction sequences in concentrated solution and in cell. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 175-204.

de *passo limitante da velocidade* da via. Em geral, esses passos limitantes da velocidade são reações muito exergônicas e, nas condições celulares, essencialmente irreversíveis. *As enzimas que catalisam esses passos exergônicos, limitantes da velocidade, são comumente os alvos da regulação metabólica.* Em adição à regulação alostérica muito rápida dentro das células individuais, os organismos multicelulares empregam sinais hormonais mais lentos para coordenar as atividades metabólicas dos diferentes tecidos e órgãos (Capítulo 23). A ação hormonal altera a atividade de enzimas-chave, dentro de segundos ou minutos. Quando as circunstâncias externas mudam em uma escala de tempo maior, como por exemplo a alimentação de uma pessoa muda principalmente de gordurosa para principalmente açucarada, os ajustes do fluxo através das vias específicas são realizados por mudanças nas velocidades de síntese e degradação das próprias enzimas reguladoras, o que representa o nível de controle mais lento (Capítulos 27 e 28).

Muitas enzimas reguladoras estão situadas em pontos críticos do metabolismo; suas atividades determinam a alocação de um metabólito para cada uma das várias vias, através das quais ele pode passar. Por exemplo, a glicose-6-fosfato pode ser metabolizada quer pela glicólise quer pela via das pentoses fosfato (descrita ainda neste capítulo). Em cada uma dessas vias, a primeira enzima (a fosfofrutoquinase-1 e a glicose-6-fosfato desidrogenase, respectivamente) é exclusivamente dela e catalisa o passo "decisivo" para o substrato, isto é, o passo que decide o destino metabólico deste. Ambas são enzimas reguladoras e respondem a uma variedade de reguladores alostéricos que sinalizam a necessidade por produtos em cada via.

As células são, em geral, enzimaticamente capazes de desenvolver tanto o catabolismo de uma molécula complexa em produtos mais simples quanto a conversão anabólica desses produtos na molécula inicial. A glicólise degrada a glicose até piruvato; a gliconeogênese converte piruvato em glicose. Vias catabólicas e anabólicas paralelas freqüentemente empregam muitas das mesmas enzimas, em geral aquelas que catalisam reações facilmente reversíveis. A fosfogliceratomutase, por exemplo, age nas duas vias, glicólise e gliconeogênese. Entretanto, as vias paralelas empregam, quase invariavelmente, ao menos uma enzima na direção catabólica diferente da enzima que catalisa a reação reversa, na direção anabólica. Essas enzimas distintivas são pontos de regulação das duas vias opostas. As reações catalisadas pelas enzimas específicas da via são, geralmente, reações exergônicas, irreversíveis sob condições celulares e fora do equilíbrio no estado estacionário; elas são limitadas enzimaticamente e não limitadas pelo substrato. Dispor de enzimas separadas para a via catabólica e para a via anabólica permite separar a regulação do fluxo em cada uma das direções, evitando-se o desperdício de um "ciclo fútil" que resultaria se fosse permitido que ocorressem simultaneamente a quebra e a ressíntese com consumo de energia de um mesmo composto. As enzimas reguladoras que controlam a velocidade de quebra dos carboidratos através da via glicolítica ilustram estes principios gerais de regulação metabólica.

A glicólise e a gliconeogênese são reguladas de maneira coordenada

Muitos organismos conseguem sintetizar a glicose a partir de precursores mais simples como o piruvato ou o lactato. Nos mamíferos, esse processo, chamado de **gliconeogênese**, ocorre primariamente no fígado e sua função é prover glicose para ser exportada para outros tecidos, sempre que as demais fontes de glicose estiverem exauridas. A gliconeogênese emprega a maioria das enzimas que atuam na glicólise, mas não é a simples reversão da via glicolítica. Sete das reações da via glicolítica são livremente reversíveis e as enzimas que catalisam essas reações também atuam na neoglicogênese. Três reações da glicólise são tão exergônicas que são também essencialmente irreversíveis: são as reações catalisadas pela hexoquinase, pela PFK-1 e pela piruvato quinase. O fluxo neoglicogenético contorna cada um desses passos irreversíveis; por exemplo, a conversão da frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato é catalisada pela **frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1)** (Fig. 15-17).

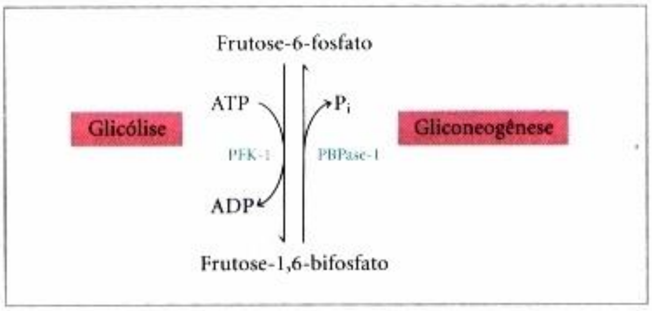
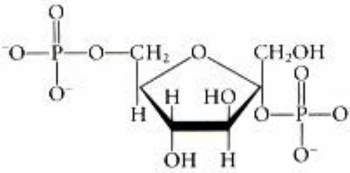


Figura 15-17 – A reação da gliconeogênese que contorna a reação irreversível da glicólise da fosfofrutoquinase-1. A conversão da frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato é catalisada pela frutose-1,6-bifosfatase (chamada de FBPase-1 para distingui-la de uma enzima similar que atua na gliconeogênese, veja Tabela 20-2).

Para prevenir um ciclo dissipador de energia, no qual a glicose é simultaneamente degradada pela glicólise e sintetizada pela neoglicogênese, as enzimas que pertencem unicamente a cada uma das vias são reguladas de maneira recíproca por efetores alostéricos comuns. A frutose-2,6-bifosfato, um potente ativador da PFK-1 e, portanto da glicólise, é um inibidor da FBPase-1 e, portanto, da gliconeogênese.

O **glucagon**, um hormônio liberado pelo pâncreas para sinalizar níveis baixos de glicose no sangue, faz baixar o nível de frutose-2,6-bifosfato no fígado, diminuindo assim o consumo de glicose pela glicólise e estimulando a produção dela pela gliconeogênese; o fígado libera essa glicose no sangue. Retornaremos a essa regulação coordenada em uma discussão mais completa no Capítulo 20.



Frutose-2,6-bifosfato

A frutose-2,6-bifosfato é encontrada em todos os animais, nos fungos e em algumas plantas, mas não em bactérias. Ela estimula a atividade da PFK-1 em todos animais e na levedura. Nas plantas, a frutose-2,6-bifosfato regula o metabolismo dos carboidratos ativando a fosfofrutoquinase dependente de PP_i que é responsável pela formação de frutose-1,6-bifosfato durante a glicólise (pág. 413), mas ela não ativa a PFK-1 ATP dependente dos vegetais. A PFK-1 dos vegetais, entretanto, é fortemente inibida pelo fosfoenolpiruvato, um intermediário glicolítico posterior à frutose-1,6-bifosfato na via metabólica.

A fosfofrutoquinase-1 é controlada por regulação alostérica complexa

A glicose-6-fosfato pode fluir tanto para a glicólise como para uma das vias oxidativas secundárias descritas, posteriormente, neste capítulo. A reação irreversível catalisada pela PFK-1 é o passo que compromete a célula com a metabolização da glicose por meio da glicólise. Em adição aos sítios de ligação para seus substratos, a frutose-6-fosfato e o ATP, essa enzima complexa tem vários sítios de regulação nos quais ativadores ou inibidores alostéricos podem se ligar.

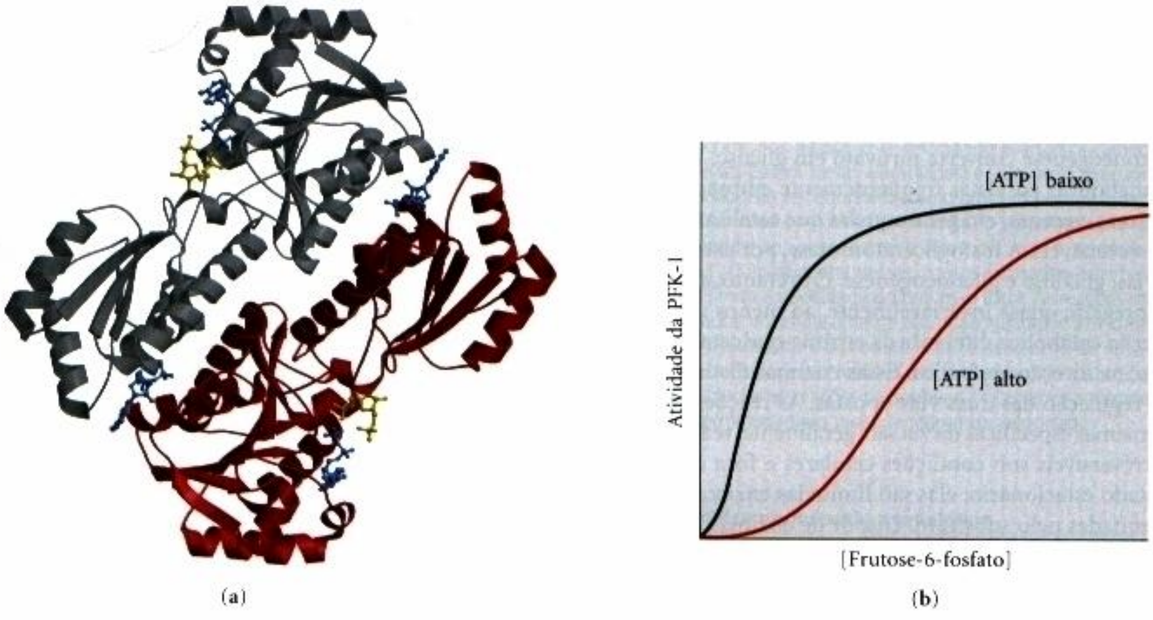
O ATP não é apenas o substrato para a PFK-1, mas também o produto final da via glicolítica. Quando níveis altos de ATP sinalizam que a célula está produzindo ATP mais rápido do que o consome, o ATP inibe a PFK-1 ligando-se a um sítio alostérico e diminuindo a afinidade da enzima pelo seu outro substrato, a frutose-6-fosfato (Fig. 15-18). Quando o consumo de ATP ultrapassa a sua produção, o ADP e o AMP aumentam de concentração e agem alostericamente para diminuir essa inibição pelo ATP. Esses efeitos se combinam para produzir atividades maiores da enzima quando a frutose-6-fosfato, ADP ou AMP aumentam de concentração e para baixar a atividade quando o ATP se acumula.

O citrato (a forma ionizada do ácido cítrico), um intermediário-chave na oxidação aeróbica do piruvato (Capítulo 16), também age como um regulador alostérico da PFK-1; concentrações altas de citrato aumentam o efeito inibidor do ATP, reduzindo ainda mais o fluxo da glicose por meio da glicólise. Nesse caso, como em vários outros que serão descritos mais adiante, o nível de citrato funciona como um sinal intracelular de que as necessidades metabólicas por energia e por intermediários estão sendo satisfeitas adequadamente.

O regulador alostérico mais significativo da PFK-1 é a frutose-2,6-bifosfato que, como foi observado anteriormente, ativa fortemente a enzima.

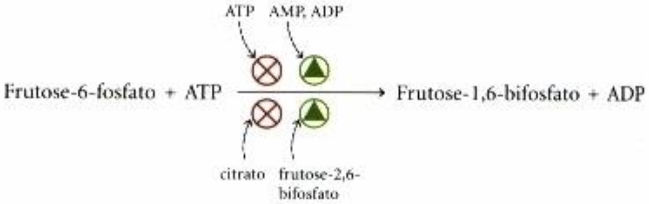
A hexoquinase é inibida alostericamente pelo seu produto

A hexoquinase, que catalisa a entrada de glicose livre na via glicolítica, é outra enzima reguladora. A hexoquinase dos miócitos tem uma alta afinidade pela glicose (ela está meio saturada em concentrações de 0,1mM de glicose). A glicose que entra nos miócitos a partir do sangue (no qual as concentrações de glicose são 4 a 5mM) produz uma concentração intracelular de glicose suficientemente alta para saturar a hexoquinase, de tal forma que ela normalmente atua na sua velocidade máxima. A hexoquinase muscular é inibida alostericamente pelo seu produto, a glicose-6-fosfato. Sempre que a concentração de glicose-6-fosfato no interior da célula aumenta acima do seu nível normal, a hexoquinase é inibida de forma temporária e reversível, colocando a velocidade de formação da glicose-6-fosfato em equilíbrio com a sua velocidade de utilização e restabelecendo o estado de equilíbrio estacionário.



(a)

(b)



(c)

Figura 15-18 – A fosfofrutoquinase-1 e sua regulação. (**a**) Modelo em fita da estrutura tridimensional da fosfofrutoquinase-1 da *E. coli*, mostrando duas de suas quatro subunidades idênticas. Cada subunidade tem o seu próprio sítio catalítico, onde o ADP (azul) e a frutose-1,6-bifosfato (amarelo) estão quase em contato mútuo, e seus próprios sítios de ligação para o ativador alostérico: o ADP (azul), localizado na interface entre as subunidades. (**b**) A regulação alostérica da PFK-1 de músculo pelo ATP, mostrada por meio de uma curva de variação da atividade em função da concentração do substrato. Em concentrações baixas de ATP, o $K_{0,5}$ (pág. 216) para a frutose-6-fosfato é relativamente pequeno, permitindo à enzima funcionar com altas velocidades em concentrações relativamente pequenas de frutose-6-fosfato. Em concentrações altas de ATP, o $K_{0,5}$ para frutose-6-fosfato aumenta drasticamente, como indicado pela relação sigmóide entre a concentração do substrato e a atividade enzimática. (**c**) Um resumo esquemático dos reguladores que afetam a atividade da PFK-1. Aqui os símbolos são os mesmos empregados ao longo deste livro: ⊗ para inibição, ▲ para ativação.

Os mamíferos possuem várias formas de hexoquinase, e todas elas catalisam a conversão de glicose em glicose-6-fosfato. Proteínas diferentes que catalisam a mesma reação são chamadas de **isozimas** (Adendo 15-3). As diferentes isozimas do fígado e do músculo refletem os diferentes papéis desses órgãos no metabolismo dos carboidratos: os músculos consomem a glicose empregando-a para a produção de energia, já o fígado produz e distribui a glicose para os demais tecidos. A isozima da hexoquinase predominante no fígado é a hexoquinase D, também chamada de **glicoquinase**, que difere das isozimas das hexoquinases do músculo em dois importantes aspectos.

Primeiro, a concentração de glicose na qual a glicoquinase está meio saturada é muito maior, perto de 10mM, que a concentração usual da glicose no sangue. Como a concentração de glicose no hepatócito é mantida em valores próximos daqueles existentes no sangue, graças a um eficiente sistema de transporte de glicose, essa propriedade da glicoquinase permite a sua regulação direta pelo nível de glicose sangüínea. Quando a concentração da glicose no sangue está alta, como logo após uma refeição rica em carboidratos, o excesso de glicose sangüínea é transportado para o interior dos hepatócitos, onde a glicoquinase o converte em glicose-6-fosfato.

Segundo, a glicoquinase não é inibida pelo seu produto de reação, a glicose-6-fosfato, mas por seu isômero, a frutose-6-fosfato, a qual está sempre em equilíbrio com a glicose-6-fosfato devido à ação da enzima fosfoglicose isomerase. A inibição parcial da glicoquinase pela frutose-6-fosfato é mediada por uma proteína adicional, a **proteína reguladora**. Essa proteína reguladora também tem afinidade pela frutose-1-fosfato e compete com a frutose-6-fosfato, cancelando o seu efeito inibidor sobre a glicoquinase. Como a frutose-1-fosfato está presente no fígado apenas quando há frutose no sangue, essa propriedade da proteína reguladora explica a observação de que a frutose ingerida estimula a fosforilação da glicose no fígado.

As células pancreáticas β, responsáveis pela liberação da insulina quando os níveis de glicose sobem acima do normal, também contêm glicoquinase e a proteína reguladora.

A piruvato quinase é inibida pelo ATP

Nos vertebrados existem ao menos três formas isozimáticas da piruvato quinase, elas apresentam entre si pequenas diferenças na distribuição nos diferentes tecidos e na resposta aos moduladores alostéricos. Altas concentrações de ATP inibem a piruvato quinase alostericamente, diminuindo a afinidade da enzi-

Adendo 15-3 Isozimas: proteínas diferentes que catalisam a mesma reação

As várias formas de hexoquinase encontradas nos tecidos dos mamíferos são um exemplo de uma situação comum, na qual a mesma reação é catalisada por duas ou mais formas moleculares diferentes de uma mesma enzima. Essas formas múltiplas, chamadas de isozimas ou isoenzimas, podem ocorrer na mesma espécie, no mesmo tecido, ou até mesmo na mesma célula. As formas variadas da enzima geralmente diferem nas suas propriedades cinéticas ou reguladoras, no tipo de co-fator que empregam (NADH ou NADPH para as isozimas desidrogenases, por exemplo) ou na sua distribuição subcelular (solúvel ou ligada à membrana). As isozimas comumente têm seqüências de aminoácidos similares, embora não idênticas, e em muitos casos elas claramente compartilham a mesma origem evolucionária.

Uma das primeiras enzimas que se demonstrou possuir formas isozímicas foi a lactato desidrogenase (LDH) (pág. 419). A LDH ocorre nos tecidos dos vertebrados em pelo menos cinco formas isozímicas separáveis por eletroforese. Todas as isozimas LDH contêm quatro cadeias polipeptídicas (cada uma de M_r 33.500), mas as cinco isozimas contêm diferentes proporções das duas formas de polipeptídeos que diferem em composição e seqüência. A cadeia A (também designada M para músculo) e a cadeia B (também designada H, da palavra em inglês: "heart", "coração") são codificadas por dois genes diferentes. No músculo esquelético, a isozima predominante contém quatro cadeias A, e, no coração, a isozima predominante contém quatro cadeias B. As isozimas da LDH em outros tecidos são uma mistura das cinco possibilidades, que podem ser designadas A_4, A_3B, A_2B_2, AB_3 e B_4. As diferentes isozimas da LDH têm valores de $V_{máx}$ e de K_m significativamente diferentes, particularmente para o piruvato. As propriedades da isozima de LDH A_4 favorecem a redução rápida de concentrações baixas de piruvato em lactato no músculo esquelético, enquanto aquelas da isozima B_4 tendem a favorecer a oxidação rápida do lactato a piruvato no coração.

A distribuição de diferentes formas isozímicas de uma dada enzima reflete, no mínimo, quatro fatores:

1. *Os diferentes padrões metabólicos em diferentes órgãos.* As duas formas da fosforilase do glicogênio encontradas no músculo esquelético e no fígado diferem em suas propriedades reguladoras, refletindo os diferentes papéis da quebra do glicogênio nesses dois tecidos.

2. *As localizações diferentes e os papéis metabólicos de uma dada enzima dentro de um mesmo tipo de célula.* As isozimas da isocitrato desidrogenase do citosol e da mitocôndria são um exemplo (Capítulo 16).

3. *Os estágios diferentes de desenvolvimento dos tecidos adultos e de suas formas fetais ou embriônicas.* Por exemplo, o fígado fetal tem uma distribuição característica das isozimas da LDH, que muda à medida que o órgão sofre diferenciação para sua forma adulta. Parte das enzimas do catabolismo da glicose em células malignas (cancerosas) ocorre em sua forma isozímica fetal, diferente da adulta.

4. *Respostas diferentes das diferentes formas isozímicas diante de moduladores alostéricos.* A hexoquinase D (glicoquinase) do fígado e as isozimas da hexoquinase encontradas em outros tecidos diferem em sua sensibilidade à inibição exercida pela glicose-6-fosfato.

ma por seu substrato, o fosfoenolpiruvato (PEP). O nível de PEP normalmente encontrado nas células não é alto o suficiente para saturar a enzima, e a velocidade da reação será correspondentemente baixa.

A piruvato quinase também é inibida pelo acetil-CoA e por ácidos graxos de cadeia longa, ambos são importantes combustíveis para o ciclo do ácido cítrico (lembre-se de que o acetil-CoA (acetato) é produzido pelo catabolismo dos ácidos graxos e dos aminoácidos, bem como pelo catabolismo da glicose; veja Fig. 4, pág. 381). Como o ciclo do ácido cítrico é a maior fonte de energia para a produção de ATP, a disponibilidade desses outros combustíveis reduz a dependência da síntese de ATP pela glicólise. Assim, sempre que a célula tem uma alta concentração de ATP, ou sempre que haja amplas quantidades de combustíveis disponíveis para a liberação de energia por meio da respiração celular, a glicólise é inibida pelo rebaixamento da atividade da piruvato quinase. Quando a concentração de ATP cai, a afinidade da piruvato quinase por PEP aumenta, possibilitando à enzima catalisar a síntese do ATP via fosforilação do substrato no nível do substrato, mesmo que a concentração de PEP seja relativamente baixa. O resultado é manutenção da concentração de ATP no estado de equilíbrio estacionário.

A fosforilase do glicogênio é regulada de forma alostérica e por meio de hormônios

Nos músculos, a função principal da glicólise é a produção de ATP, e a velocidade dela aumenta à medida que os músculos trabalham mais ativamente demandando mais ATP. O fígado tem um papel diferente: manter constante a concentração de glicose sangüínea pela produção e exportação de moléculas de glicose quando os demais tecidos demandarem por ela, e importação e estocagem de glicose quando esta, provindo da alimentação, estiver em excesso. Como já vimos, a mobilização do glicogênio estocado é feita pela fosforilase do glicogênio, enzima que degrada o polissacarídeo em glicose-1-fosfato (Fig. 15-12). A regulação da fosforilase do glicogênio é um exemplo especialmente instrutivo de regulação enzimática. Ela foi o primeiro caso conhecido de uma enzima regulada alostericamente e a primeira enzima que se demonstrou ser controlada por fosforilação reversível. Ela também foi uma das primeiras enzimas alostéricas para a qual as estruturas tridimensionais das formas ativa e inativa foram reveladas por estudos cristalográficos com raios X.

A isozima de fosforilase do glicogênio existente no músculo esquelético ocorre em duas formas interconvertíveis: **fosforilase *a***, que é cataliticamente ativa, e **fosforilase *b***, que é menos ativa. A forma *b* da fosforilase predomina no músculo em repouso, mas durante a atividade muscular vigorosa o hormônio epinefrina provoca a fosforilação de um resíduo específico de serina na forma *b* da fosforilase, convertendo-a em fosforilase *a*. Os detalhes do mecanismo de ativação por fosforilação da fosforilase são apresentados nas páginas 217-219, em que a fosforilase do glicogênio serviu como exemplo desse tipo de controle. A forma ativada da fosforilase acelera a quebra do glicogênio suprindo a glicose-1-fosfato para a produção do ATP necessário para fornecer energia para a contração do músculo. A enzima fosforilase *b* quinase, responsável pela ativação da fosforilase por transferência de um grupo fosforil para seu resíduo de serina, é, também ela, ativada por epinefrina por meio de uma série de passos descritos em detalhe na Figura 13-15. Quando o músculo retorna ao repouso, uma segunda enzima (fosforilase *a* fosfatase) remove o grupo fosforil da fosforilase *a*, convertendo-a em sua forma inativa ou fosforilase *b*.

Superpostos à regulação da fosforilase por modificação covalente estão dois mecanismos de controle alostérico. O Ca^{2+} é o sinal para o início da contração muscular e, ao mesmo tempo se liga e ativa a fosforilase *b* quinase promovendo, assim, a conversão da forma inativa para a ativa da fosforilase ou, em outras palavras, da forma *b* na forma *a*. O AMP que se acumula durante as contrações musculares vigorosas e continuadas também se une e ativa a fosforilase *b*, sem, entretanto, transformá-la na forma *a*. Quando os níveis de ATP voltam a ser adequados, ele bloqueia o sítio alostérico ao qual o AMP se liga, voltando a forma *b* a exibir seu nível de atividade baixo.

No fígado, a fosforilase do glicogênio é regulada pelo hormônio glucagon e por mecanismos alostéricos. Quando a concentração da glicose no sangue está muito baixa, o glucagon ativa a fosforilase *b* quinase, esta converte a fosforilase *b* inativa em sua forma ativa *a*, iniciando assim a liberação de glicose no sangue. Quando os níveis de glicose no sangue retornam ao normal, a glicose entra nos hepatócitos e se liga a um sítio alostérico da fosforilase *a* (Fig. 15-19). Isso produz uma mudança conformacional que expõe os resíduos de serina fosforilados à ação da fosforilase *a* fosfatase, esta remove os grupos fosforil e inativa a fosforilase. Os detalhes desse processo regulatório complexo são discutidos no Capítulo 23, quando se faz a comparação da regulação da fosforilase do glicogênio com a regulação da enzima oposta a ela, a sintase do glicogênio, a enzima que sintetiza glicogênio a partir de glicose. Essas duas enzimas estão sob regulação não só recíproca mas também muito fina.

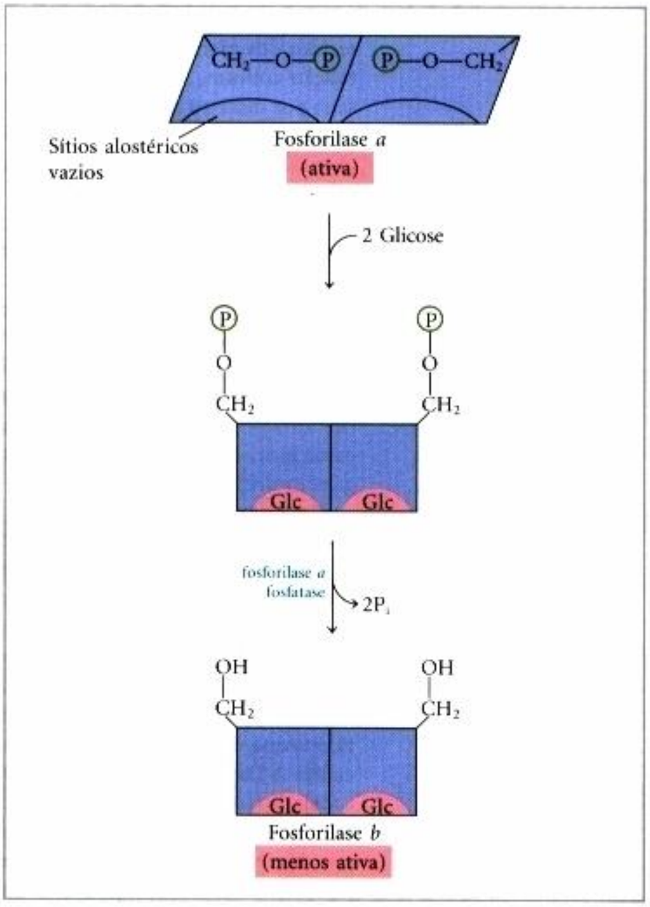


Figura 15-19 – A fosforilase do glicogênio do fígado como um sensor da glicose. A ligação da glicose a um sítio alostérico da fosforilase *a* induz uma mudança conformacional que expõe resíduos de Ser fosforilados à ação da fosforilase *a* fosfatase. Essa fosfatase converte a fosforilase *a* em fosforilase *b*, reduzindo a atividade da fosforilase em resposta à glicose sangüínea alta.

A Via das Pentoses Fosfato de Oxidação da Glicose

Na maioria dos tecidos animais, a maior parte da glicose consumida é catabolizada por meio da glicólise até piruvato. A maior parte do piruvato, por sua vez, é oxidada por meio do ciclo do ácido cítrico. A principal função do catabolismo da glicose por essa via é gerar ATP. Existem, entretanto, outras vias catabólicas que podem ser o destino da glicose e que levam a produtos especializados necessários para a célula. De grande importância é a síntese das pentoses fosfato.

A **via das pentoses fosfato**, também chamada de **via do fosfogliconato**, produz NADPH e ribose-5-fosfato. Lembre-se de que o NADPH é um transportador de energia química na forma de poder redutor e é empregado como redutor quase universal nas vias anabólicas (Capítulo 14). Nos mamíferos, essa função é especialmente proeminente nos tecidos que realizam ativamente a biossíntese de ácidos graxos e esteróides, particularmente a glândula mamária, o tecido adiposo, o córtex adrenal e o fígado. Esses tecidos usam o NADPH para reduzir as ligações duplas e os grupos carbonila dos intermediários desse processo (Capítulo 21). Outros tecidos menos ativos na síntese de ácidos graxos, como o músculo esquelético, praticamente não têm a via das pentoses fosfato.

Uma segunda função da via das pentoses fosfato é gerar pentoses indispensáveis, particularmente a D-ribose, empregadas na biossíntese dos ácidos nucléicos (Capítulo 22). A biossíntese de ácidos nucléicos ocorre em grande velocidade em tecidos que estão crescendo, que estão em regeneração e, também, nos tumores.

A primeira reação da via das pentoses fosfato (Fig. 15-20) é a desidrogenação enzimática da glicose-6-fosfato pela **glicose-6-fosfato desidrogenase**, para formar 6-fosfoglicono-δ-lactona, um éster intramolecular, que é hidrolisado para a forma ácida livre 6-fosfogliconato por uma **lactonase** específica (Fig. 15-22). O $NADP^+$ é o receptor de elétrons, e o equilíbrio final está muito deslocado na direção da formação do NADPH. No passo seguinte, o 6-fosfogliconato sofre desidrogenação e descarboxilação pela **6-fosfogliconato desidrogenase** para formar a cetopentose D-ribulose-5-fosfato, uma reação que gera a segunda molécula de NADPH. A **fosfopentose isomerase** converte então a ribulose-5-fosfato no seu isômero aldose, a D-ribose-5-fosfato. Em alguns tecidos, a via das pentoses fosfato termina nesse ponto e a equação final pode ser escrita:

$$\text{Glicose-6-fosfato} + 2NADP^+ + H_2O \longrightarrow \text{ribose-5-fosfato} + CO_2 + 2NADPH + 2H^+$$

O resultado líquido é a produção de NADPH para as reações de redução biossintéticas e a produção de ribose-5-fosfato como precursora para a síntese de nucleotídeos.

Nos tecidos que requerem primariamente mais NADPH do que ribose-5-fosfato, as pentoses fosfato são recicladas em glicose-6-fosfato por meio de uma série de reações (Fig. 15-21) que serão examinadas em detalhes no Capítulo 20. Primeiro, a ribulose-5-fosfato é epimerizada em xilulose-5-fosfato. Então, em uma série de rearranjos dos esqueletos carbônicos dos açúcares fosfato intermediários, seis moléculas de açúcar fosfato de cinco átomos de carbono são convertidas em cinco moléculas de açúcar fosfato com seis átomos de carbono completando o ciclo e permitindo a oxidação contínua da glicose-6-fosfato com a produção de NADPH. Nos eritrócitos, o NADPH produzido por essa via é essencial na proteção das células contra danos causados por oxidações. Um defeito genético na glicose-6-fosfato desidrogenase pode ter conseqüências patológicas sérias (Adendo 15-4).

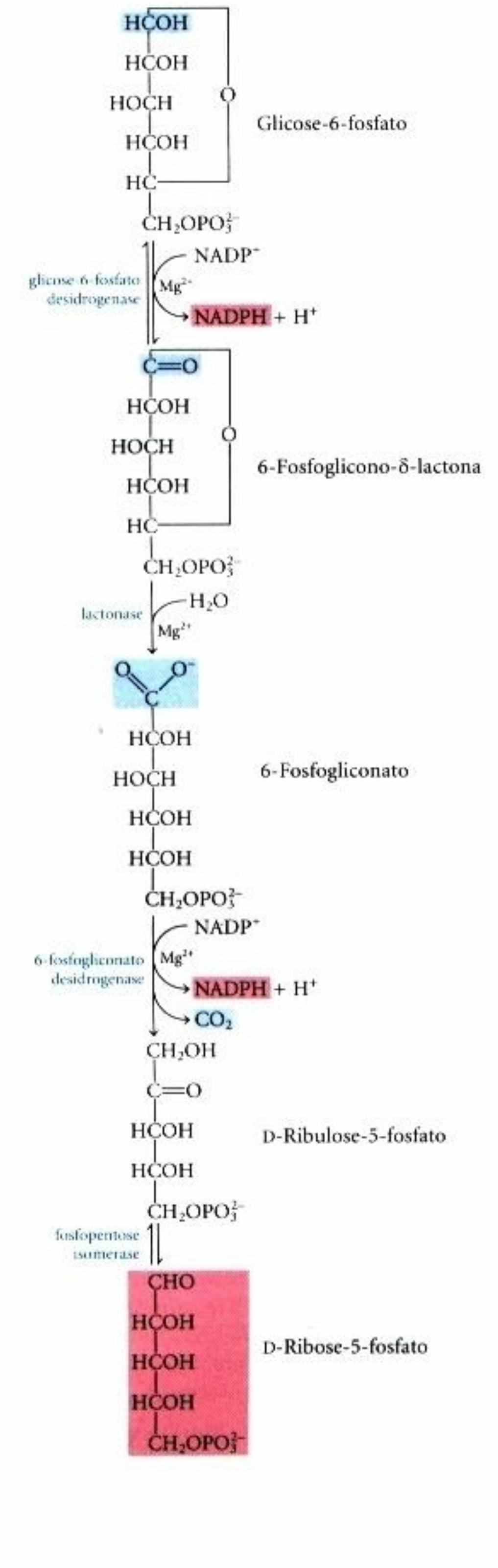


Figura 15-20 – As reações oxidativas da via das pentoses fosfato. Os produtos finais são a D-ribose-5-fosfato e o NADPH.

Adendo 15-4 Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase: porque Pitágoras não comia falafel

A fava, ou feijão fava, é um ingrediente tradicional do falafel, desde a Antiguidade um alimento importante nas regiões mediterrâneas e no Oriente Médio. O filósofo e matemático grego Pitágoras proibia seus seguidores de alimentar-se da fava, talvez porque ela deixasse muitas pessoas doentes com uma moléstia chamada "favismo", que pode ser mortal. No favismo, os eritrócitos começam a sofrer lise 24 a 48 horas depois da ingestão desses feijões, o que libera a hemoglobina no sangue. Icterícia e, algumas vezes, insuficiência renal podem resultar dessa situação. Sintomas similares podem ocorrer com a ingestão da droga contra a malária chamada primaquina ou, então, de sulfas antimicrobianas ou, ainda, em seguida à exposição a certos herbicidas. Esses sintomas têm uma base genética: a deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que afeta perto de 400 milhões de pessoas. A maioria das pessoas com deficiência da G6PD é assintomática; apenas em combinação com certos fatores ambientais ocorrem as manifestações clínicas.

A G6PD catalisa o primeiro passo na via das pentoses fosfato (veja Fig. 15-20), a qual produz NADPH. Esse redutor, essencial em muitas vias biossintéticas, também protege as células de danos provocados por substâncias oxidativas como o peróxido de hidrogênio (a água oxigenada — H_2O_2) e radicais livres superóxidos, todos oxidantes muito reativos gerados como produtos colaterais metabólicos ou, então, pela ação de drogas como a primaquina e produtos naturais como a divicina, o ingrediente tóxico presente nos feijões fava. Durante os processos normais de detoxicação, H_2O_2 é convertida em H_2O pela glutationa reduzida sob a ação da glutationa peroxidase; a glutationa oxidada resultante é reciclada na forma reduzida pela glutationa redutase e NADPH (Fig. 1). A H_2O_2 também pode ser quebrada em H_2O e O_2 pela ação da enzima catalase. Nos indivíduos com deficiência da G6PD, a produção de NADPH fica diminuída e a detoxicação da H_2O_2 inibida. Disso resulta dano celular: ocorre oxidação do DNA e de proteínas e peroxidação de lipídios, com conseqüente rompimento da membrana do eritrócito.

A distribuição geográfica da deficiência da G6PD é instrutiva. Freqüências tão altas como 25% ocorrem na África tropical, partes do Oriente Médio e no sudeste da Ásia, todas áreas em que a malária é prevalente. Além dessas observações epidemiológicas, estudos *in vitro* mostraram que o crescimento de uma das formas do parasita da malária, *Plasmodium falciparum*, é inibido no interior de eritrócitos com deficiência da G6PD. O parasita é muito sensível aos danos oxidativos e é morto por um nível de tensão oxidativa que é tolerável para o hospedeiro humano portador da deficiência da G6PD. Essa vantagem de resistir ao agente da malária equilibra a desvantagem de resistência diminuída diante de danos oxidativos, assim a seleção natural mantém o genótipo deficiente em G6PD em populações humanas que vivem em regiões de prevalência da malária. Apenas sob insuportáveis tensões oxidativas, causadas por drogas, herbicidas ou divicina, a deficiência causa problemas médicos graves.

Acredita-se que a droga antimalárica primaquina atue causando tensão oxidativa no parasita. É irônico que tais drogas antimaláricas possam provocar doença por meio do mesmo mecanismo bioquímico que provê resistência à malária. A divicina também pode agir como droga antimalárica, e a ingestão de feijões fava pode proteger as pessoas dessa doença. Recusando-se a comer falafel, muitos pitagóricos com atividade de G6PD normal podem, inadvertidamente, ter aumentado o risco de contrair malária.

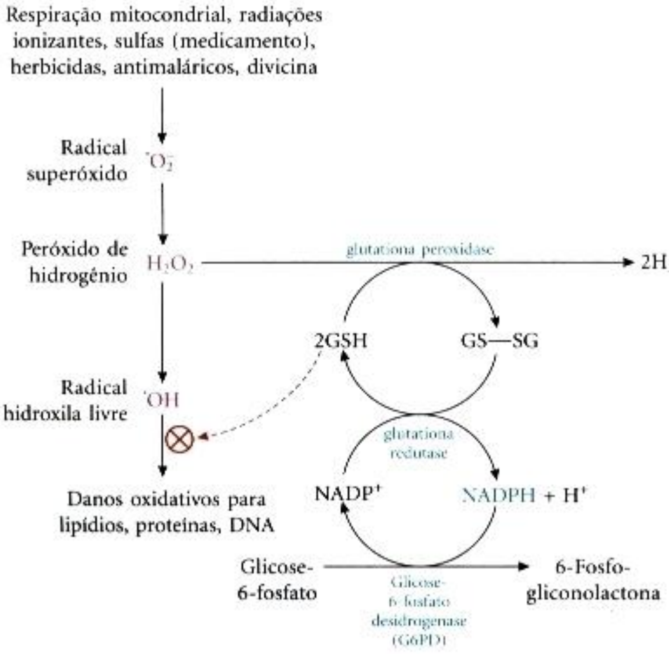


Figura 1 – Funções do NADPH e da glutationa na proteção das células contra derivados do oxigênio muito reativos. A glutationa reduzida (GSH) protege a célula destruindo o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila livres. A regeneração da GSH de sua forma oxidada (GS-SG) requer o NADPH produzido na reação da glicose-6-fosfato desidrogenase.

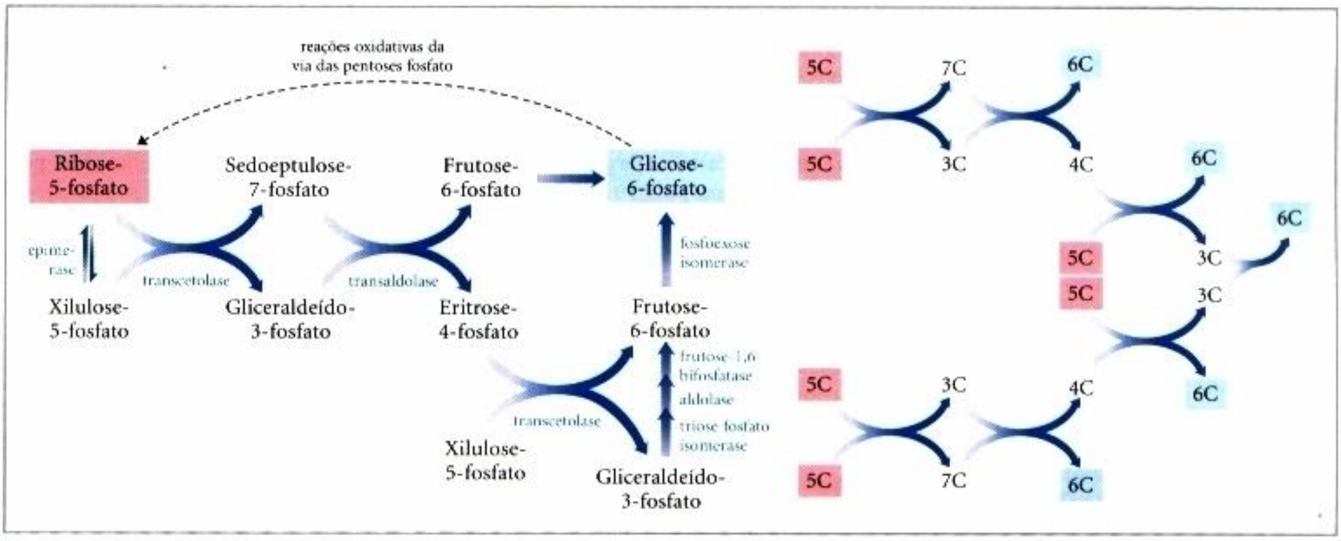


Figura 15-21 – As reações não-oxidativas da via das pentoses fosfato. Estas reações (**a**) convertem as pentoses fosfato em hexoses fosfato, permitindo que as reações oxidativas (veja Fig. 15-20) sejam contínuas. As enzimas transaldolases e transcetolases (discutidas em detalhes no Capítulo 19) são específicas para essa via; as outras enzimas também funcionam nas vias glicolítica e gliconeogênica. (**b**) Um diagrama esquemático simplificado mostrando a transformação de seis pentoses (5C) em cinco hexoses (6C). Note que isso envolve dois conjuntos de interconversões, como mostrado em (**a**). Todas as reações mostradas aqui são reversíveis, as setas unidirecionais são usadas apenas para tornar clara a direção das reações durante a oxidação contínua da glicose-6-fosfato. Nas reações independentes de luz da fotossíntese, a direção dessas reações é reversa (veja Fig. 20-26).

Na parte não-oxidativa da via das pentoses fosfato (Fig. 15-21a), a transcetolase, uma enzima dependente de tiamina pirofosfato, catalisa a transferência de um fragmento de dois átomos de carbono (C-1 e C-2) da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato, formando um produto com sete átomos de carbono denominado sedoeptulose-7-fosfato; o fragmento com três átomos de carbono remanescente da xilulose é o gliceraldeído-3-fosfato (veja Fig. 20-27). A transaldolase catalisa então uma reação similar à reação da aldolase na glicólise: um fragmento de três átomos de carbono é removido da sedoeptulose-7-fosfato e condensado com o gliceraldeído-3-fosfato, formando frutose-6-fosfato; o fragmento remanescente de quatro átomos de carbono da sedoeptulose é a eritrose-4-fosfato. Agora a transcetolase age novamente, formando frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato a partir da eritrose-4-fosfato e xilulose-5-fosfato. Duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato formadas pelas duas interações dessas reações podem ser convertidas em uma molécula de frutose-1,6-bifosfato (Fig. 15-21b). O ciclo é, então, completado: seis pentoses fosfato foram reconvertidas em cinco hexoses fosfato.

Todas as reações da parte não-oxidativa da via das pentoses fosfato são prontamente reversíveis e assim também fornecem uma maneira de converter hexoses fosfato em pentoses fosfato. Como veremos no Capítulo 20, essa conversão é essencial na fixação fotossintética do CO_2 pelos vegetais.

Resumo

A glicólise é uma via metabólica universal para o catabolismo da glicose até piruvato acompanhado pela formação de ATP. O processo é catalisado por 10 enzimas citosólicas e todos os intermediários são compostos fosforilados. Na fase preparatória da glicólise, o ATP é investido para converter glicose no intermediário frutose-1,6-bifosfato, então a ligação carbono-carbono entre C-3 e C-4 é quebrada para formar duas moléculas de triose fosfato. Na fase de "pagamento" da glicólise, cada uma das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato formada da glicose sofre oxidação em C-1; a energia dessa reação de oxidação é conservada na redução do NADH e formação de uma ligação acil-fosfato no 1,3-bifosfoglicerato. Esse composto tem um alto potencial de transferência de grupo fosfato e, em uma fosforilação no nível do substrato pela fosfogliceratoquinase, o seu grupo fosfato é transferido para o ADP, formando ATP e 3-fosfoglicerato. O rearranjo dos átomos no 3-fosfoglicerato com a perda de H_2O dá origem ao fosfoenolpiruvato, outro composto com alto potencial de transferência do grupo fosfato. O fosfoenolpiruvato doa um grupo fosfato para o ADP para formar ATP na segunda fosforilação no nível do substrato; o outro produto dessa reação é o piruvato, o produto final da fase de pagamento da glicólise. A equação final para a glicólise é

$$\text{Glicose} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

ocorre um ganho líquido de 2 ATP por molécula de glicose.

O NADH formado na glicólise precisa ser reciclado para regenerar NAD^+, que é requerido como receptor de elétrons no primeiro passo da fase de pagamento da glicólise. Em condições aeróbicas, os elétrons passam do NADH para o O_2 através da cadeia de transportadores de elétrons no processo de respiração mitocondrial. Em condições anaeróbicas ou hipóxicas, muitos organismos regeneram NAD^+

pela transferência de elétrons do NADH para o piruvato, formando lactato. Outros organismos, como o levedo, regeneram o NAD^+ pela redução do piruvato a etanol e CO_2. Nesses processos anaeróbicos, chamados de fermentações, não ocorre redução ou oxidação líquidas dos átomos de carbono da glicose.

O glicogênio e o amido, formas poliméricas de armazenamento da glicose, entram na glicólise por um processo de dois passos que começa com a clivagem fosforolítica de um resíduo de glicose de uma das extremidades do polímero, formando glicose-1-fosfato. Essa reação é catalisada pelas fosforilases do glicogênio e do amido, respectivamente. A enzima fosfoglicomutase converte então a glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato, o primeiro intermediário na glicólise. Os dissacarídeos ingeridos como alimentos são convertidos em monossacarídeos no intestino dos animais por enzimas hidrolíticas específicas situadas na superfície externa das células epiteliais do intestino; os monossacarídeos são então absorvidos e transportados até o fígado ou outros tecidos.

Um certo número de D-hexoses, incluindo frutose, manose e galactose, pode ser introduzido na glicólise. Cada uma delas é primeiro fosforilada por uma quinase que emprega ATP como doador de fosfato, sendo convertida, então, em glicose-6-fosfato ou em frutose-6-fosfato (o segundo intermediário na glicólise). A conversão da galactose-1-fosfato em glicose-1-fosfato envolve dois intermediários que são derivados nucleotídicos: UDP-galactose e UDP-glicose. Defeitos genéticos nas enzimas que catalisam a conversão da galactose em glicose-1-fosfato resultam em galactosemia, uma doença humana grave.

Em uma célula metabolicamente ativa forma-se um equilíbrio estacionário, com os intermediários sendo consumidos e formados em velocidades iguais. De grande importância para uma célula é a manutenção de uma alta concentração de ATP no estado estacionário. Quando alguma perturbação altera a velocidade de formação ou de consumo de um intermediário, ou produto como o ATP, mudanças compensatórias nas atividades de enzimas relevantes devolvem o sistema ao seu estado estacionário. Essas mudanças nas atividades enzimáticas são conseguidas por meio da regulação alostérica ou da modificação covalente (como a fosforilação) de enzimas, que é em geral disparada por sinalização hormonal.

Em processos de muitos passos como a glicólise, algumas das reações catalisadas por enzimas estão essencialmente em equilíbrio dentro do estado estacionário geral; a velocidade dessas reações aumenta e diminui com a concentração do substrato e elas são limitadas pelo substrato. Outras reações estão fora do equilíbrio; suas velocidades são muito lentas para produzir um equilíbrio instantâneo entre o substrato e o produto, e essas reações são limitadas pela enzima. As reações limitadas pela enzima, em um processo de muitos passos, são em geral altamente exergônicas e, portanto, praticamente irreversíveis; as enzimas que catalisam essas reações são comumente os pontos em que o fluxo através da via é regulado. Na via glicolítica, de glicogênio a piruvato, os passos regulados incluem aqueles catalisados pela fosforilase do glicogênio, a hexoquinase, a fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) e a piruvato quinase; todas elas são reações exergônicas e limitadas pela enzima.

A gliconeogênese é um processo de muitos passos no qual o piruvato é convertido em glicose. Parte dos passos enzimáticos da gliconeogênese é catalisada pelas mesmas enzimas empregadas na glicólise; essas são as reações limitadas pelo substrato em ambos os processos. As reações da glicólise catalisadas pelas enzimas hexoquinase, PFK-1 e piruvato quinase são essencialmente irreversíveis. Na gliconeogênese, essas três reações são contornadas por reações catalisadas por enzimas diferentes. Para prevenir os "ciclos fúteis", a produção e o consumo simultâneos de componentes celulares (glicose, nesse caso), as reações limitadas por enzima nas reações da glicólise e da gliconeogênese são submetidas a controle alostérico recíproco por meio de efetores comuns; quando as reações glicolíticas são estimuladas, as reações gliconeogenéticas são inibidas e vice-versa. A frutose-2,6-bifosfato é um ativador alostérico da PFK-1 (glicólise) e um inibidor alostérico da frutose-1,6-bifosfatase (gliconeogênese). O hormônio glucagon dispara uma série de mudanças enzimáticas que provocam a redução do nível do regulador frutose-2,6-bifosfato. O resultado é uma diminuição na velocidade da glicólise e um aumento na velocidade da gliconeogênese.

A hexoquinase é inibida por altas concentrações do seu produto, a glicose-6-fosfato; assim, quando o produto da reação se acumula, a sua velocidade de formação é diminuída. A piruvato quinase é inibida alostericamente, de forma semelhante, por um dos seus produtos, o ATP.

A fosforilase do glicogênio libera as moléculas de glicose estocadas na forma de glicogênio e é ativada por meio de fosforilação catalisada pela fosforilase quinase, a qual, por sua vez, é ativada por reações disparadas pela epinifrina. A remoção dos grupos fosforil por uma fosfatase específica inativa a fosforilase do glicogênio. Isozimas da fosforilase do glicogênio presentes no fígado e nos músculos diferem na maneira de regulação, refletindo os diferentes papéis que esses dois tecidos representam na regulação do metabolismo da glicose. A atividade da fosforilase do glicogênio do fígado é, ainda, regulada pela concentração de glicose no sangue (glicemia), permitindo ao fígado tamponar possíveis variações dessa concentração.

A via das pentoses fosfato é uma via alternativa oxidativa para a glicose. Ela resulta em oxidação e descarboxilação na posição C-1 da glicose, produzindo NADPH e pentoses fosfato. O NADPH fornece radicais redutores para as reações celulares biossintéticas, e as pentoses fosfato são precursores essenciais das biossínteses de nucleotídeos e ácidos nucléicos.

Leitura Adicional

Geral

Dennis DT. (1987) *The Biochemistry of Energy Utilization in Plants,* Chapman & Hall, New York.

Uma apresentação curta sobre as reações conservadoras de energia nos vegetais superiores, escrita no mesmo nível deste livro: inclui um capítulo muito bom (Capítulo 6) sobre a glicólise e a via das pentoses fosfato.

Fell D. (1997) *Understanding the control of Metabolism,* Portland Press, Miami.

Uma introdução muito interessante às teorias básicas sobre o metabolismo e sua regulação; inclui tópicos controversos não discutidos neste capítulo.

Fruton JS. (1972) *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology,* Wiley-Interscience, New York.

Esse texto inclui um relato histórico detalhado das pesquisas sobre a glicólise.

Suarez RK, Staples JF, Lighton JR, & West TG. (1997) Relationships between enzymatic flux capacities and metabolic flux rates: nonequilibrium reactions in muscle glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7065-7069.

Glicólise

Phillips D, Blake CCF, & Watson HC. (eds) (1981) The Enzymes of Glycolysis: Structure, Activity and Evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]* **293**, 1-214.

Uma coleção de excelentes revisões sobre as enzimas da glicólise, escritas em um nível desafiador, mas compreensível para os estudantes principiantes em bioquímica.

Physiological Significance of Metabolite Channeling. (1991) *J. Theor. Biol.* **152**, 1-140.

Um volume especial contendo uma coleção de 29 escritos breves sobre todos os aspectos da canalização de metabólitos.

Plaxton WC. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**, 185-214.

Uma revisão muito útil da localização intracelular das enzimas da via glicolítica e da regulação da glicólise nas plantas.

Srivastava DK & Bernhard SA. (1987) Biophysical chemistry of metabolic reaction sequences in concentrated enzyme solution and in the cell. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 175-204.

Uma discussão detalhada das evidências sobre as interações proteína-proteína em soluções concentradas de proteínas, com exemplos retirados da via glicolítica.

Hochachka PW. (1980) *Living Without Oxygen: Closed and Open Systems in Hypoxia Tolerance,* Harvard University Press, Cambridge, MA.

Bioquímica e fisiologia comparadas da glicólise em diferentes organismos sob condições anaeróbicas.

Van Beers EH, Buller HA, Grand RJ, Einerhand AWC, & Dekker J. (1995) Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function and development. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 197-262.

Regulação do metabolismo dos carboidratos

Barford D, Hu S-H & Johnson LN. (1991) Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J. Mol. Biol.* **218**, 233-260.

Uma discussão clara das variações reguladoras na estrutura da fosforilase do glicogênio, baseada nas estruturas das formas ativa e inativa da enzima, obtidas por estudos de difração de raios X.

Dang CV & Semenza GL. (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68-72.

Depre C, Rider MH, & Hue L. (1998) Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* **258**, 277-290.

Heinrich R, Melendez-Hevia E, Montero F, Nuno JC, Stephani A, & Waddell TG. (1999). The structural design of glycolysis: an evolutionary approach. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 261-264.

Hudson JW, Golding GB, & Crerar MM. (1993) Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J. Mol. Biol.* **234**, 700-721.

Hue L & Rider MH. (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* **245**, 313-324.

Mathupala SP, Rempel A, & Pedersen PL. (1997) Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, pos-translational, and mutational events that leads to a critical role for type II hexokinase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 339-343.

Ochs RS, Hanson RW, & Hall J. (eds) (1985) *Metabolic Regulation,* Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Uma coleção de ensaios curtos publicados inicialmente no *Trends in Biochemical Sciences*, mais conhecido como TIBS.

Pilkis SJ & Granner DK. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic glyconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885-909.

Schirmer T, & Evans PR. (1990) Structural basis of the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* **343**, 140-145.

Vias alternativas de oxidação da glicose

Chayen J, Howat DW, & Bitensky L. (1986) Cellular biochemistry of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 249-253.

Luzzato L & Mehta A. (1995) Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th edn* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., & Valle, D., eds), pp. 3367-3398, McGraw-Hill Book Company, New York.

Em três volumes, esse tratado está repleto de informações fascinantes a respeito das características bioquímicas e clínicas de centenas de doenças hereditárias do metabolismo.

Tephyl TR & Burchell B. (1990) UDP-glucuronosyl transferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 276-279.

Wood T. (1986) Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 241-247.

Problemas

1. Equação da fase preparatória da glicólise. Escreva equações balanceadas para todas as reações do catabolismo da D-glicose em duas moléculas de D-gliceraldeído-3-fosfato (a fase preparatória da glicólise). Para cada equação escreva a variação da energia livre padrão. Escreva, então, a equação geral da fase preparatória da glicólise, incluindo a variação da energia livre padrão líquida.

2. O segundo estágio da glicólise no músculo esquelético. No músculo esquelético em atividade, sob condições anaeróbicas, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em piruvato (a fase de pagamento da glicólise), e o piruvato é reduzido a lactato. Escreva equações balanceadas para a seqüência de reações desse processo e a variação da energia livre padrão de cada uma delas. Depois, escreva a equação global, ou equação líquida final, do segundo estágio da glicólise, incluindo a variação líquida da energia livre padrão.

3. Caminho dos átomos na fermentação. Um experimento de pulso radioativo, utilizando como fontes de carbono substâncias marcadas com o radioisótopo ^{14}C, é realizado com um extrato de levedura mantido sob condições anaeróbicas estritas para produção de etanol. O experimento consiste em incubar uma pequena quantidade de substrato marcado com ^{14}C (o pulso) com o extrato de levedo, por um tempo suficiente apenas para que cada intermediário na via fique marcado. A marcação é então "caçada" por meio da via pela adição de glicose não-marcada. A "caça" previne, efetivamente, qualquer entrada posterior de glicose marcada na via.

(a) Se $[1\text{-}^{14}C]$ glicose (glicose marcada em C-1 com ^{14}C) é usada como substrato, qual é a localização do ^{14}C no etanol produzido? Explique.

(b) Onde o ^{14}C deve estar localizado na molécula de glicose inicial a fim de assegurar que toda a radioatividade de ^{14}C seja liberada como $^{14}CO_2$ durante a fermentação em etanol? Explique.

4. A produção por fermentação do molho de soja. O molho de soja é preparado por fermentação, por um período de 8 a 12 meses, de uma mistura salgada de feijão de soja e trigo com vários microrganismos, incluindo a levedura da cerveja. O molho resultante (depois da remoção dos sólidos) é rico em lactato e etanol. Como são produzidos esses dois compostos? Para impedir que o molho de soja tenha um sabor forte de vinagre (vinagre é ácido acético diluído), o oxigênio precisa ser mantido longe da mistura de fermentação. Por quê?

5. Equivalência das trioses fosfato. Gliceraldeído-3-fosfato marcado com ^{14}C foi adicionado a um extrato de levedura. Depois de um tempo curto, isolou-se a frutose-1,6-bifosfato marcada com ^{14}C em C-3 e C-4. Qual era a localização do ^{14}C no gliceraldeído-3-fosfato inicial? De onde proveio o segundo ^{14}C na frutose-1,6-bifosfato? Explique.

6. Atalho glicolítico. Suponha que você descobriu uma levedura mutante, cuja via glicolítica é menor devido à presença de uma nova enzima que catalisa a reação:

$$\text{Gliceraldeído-3-fosfato} + H_2 \xrightarrow[\text{3-fosfoglicerato}]{\text{NAD}^+ \curvearrowright \text{NADH} + \text{H}^+}$$

O encurtamento da via glicolítica resultante beneficiará a célula? Explique.

7. Papel da lactato desidrogenase. Em comparação com uma situação de repouso, o tecido muscular durante uma atividade intensa consome grandes quantidades de ATP. Nos músculos da perna do coelho ou nos músculos das asas do peru, esse ATP é produzido quase exclusivamente por fermentação láctica. O ATP é produzido na fase de pagamento da glicólise em duas reações enzimáticas, cada uma delas catalisadas por uma das enzimas: fosfoglicerato quinase e piruvato quinase. Suponha que um músculo esquelético seja destituído de lactato desidrogenase. Poderá ele desenvolver atividade física muito intensa; isto é, ele poderá gerar ATP em grande velocidade por meio da glicólise? Explique. Lembre-se de que a reação da lactato desidrogenase não envolve moléculas de ATP.

8. Eficiência da produção de ATP no músculo esquelético. A transformação da glicose em lactato nos miócitos libera apenas perto de 7% da energia livre obtida quando a glicose é completamente oxidada em CO_2 e H_2O. Isso significa que a glicólise anaeróbica no músculo é um desperdício de glicose? Explique.

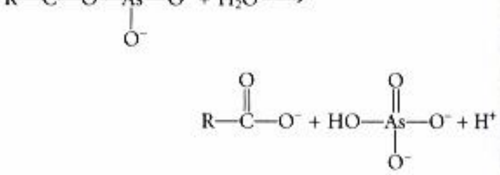
9. Variação da energia livre na oxidação da triose fosfato. A oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ocorre com uma constante de equilíbrio desfavorável ($K'_{eq} = 0{,}08$; $\Delta G'^{\circ} = +6{,}3$kJ/mol). A despeito desse equilíbrio desfavorável, o fluxo através desse ponto da via ocorre sem maiores empecilhos. Como a célula supera o equilíbrio desfavorável?

10. Estão todas as reações metabólicas em equilíbrio?

(a) O fosfoenolpiruvato (PEP) é um dos dois doadores de grupos fosforil na síntese do ATP nos eritrócitos humanos, sendo a concentração de ATP de 2,24mM no equilíbrio estacionário, a do ADP é 0,25mM e a do piruvato 0,051mM. Calcule a concentração de PEP a 25°C assumindo que a reação da piruvato quinase (veja Fig. 14-3) está em equilíbrio no interior celular.

(b) A concentração fisiológica do PEP nos eritrócitos humanos é 0,023mM. Compare este valor com aquele obtido em (a). Explique o significado dessa diferença.

11. Envenenamento por arsenato. O arsenato é estrutural e quimicamente similar ao fosfato (P_i), e muitas enzimas que trabalham com o fosfato podem empregar também o arsenato. Entretanto, compostos orgânicos de arsenato são menos estáveis que os compostos análogos de fosfato. Por exemplo, acil-arsenatos se decompõem rapidamente por hidrólise, mesmo na ausência de catalisadores:



$$R{-}\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}{-}O{-}\underset{\underset{\large O^-}{|}}{\overset{\overset{\large O}{\|}}{As}}{-}O^- + H_2O \longrightarrow R{-}\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}{-}O^- + HO{-}\underset{\underset{\large O^-}{|}}{\overset{\overset{\large O}{\|}}{As}}{-}O^- + H^+$$

Por outro lado, acil-fosfatos, como o 1,3-bifosfoglicerato, são mais estáveis e são transformados nas células por meio de ação enzimática.

(a) Faça uma previsão do efeito da substituição do fosfato por arsenato na reação líquida catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

(b) Qual será a conseqüência para um organismo se o fosfato for substituído por arsenato? O arsenato é muito tóxico para a maior parte dos organismos. Explique a razão.

12. Necessidade de fosfato para a fermentação alcoólica. Em 1906, Harden e Young realizaram uma série de estudos clássicos sobre a fermentação da glicose em etanol e

CO_2 por extratos de levedura de cerveja e fizeram as seguintes observações: (1) O fosfato inorgânico era essencial na fermentação; quando o suprimento de fosfato terminava, a fermentação cessava, ainda que restasse glicose para ser consumida. (2) Sob essas condições, durante a fermentação ocorria o acúmulo de CO_2, de etanol e de uma hexose difosfato. (3) Quando o fosfato era substituído por arsenato não ocorria o acúmulo da hexose difosfato, mas a fermentação prosseguia até que toda a glicose fosse convertida em etanol e CO_2.

(a) Por que a fermentação cessa quando o suprimento de fosfato termina?

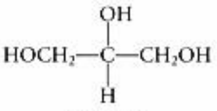
(b) Por que ocorre o acúmulo de etanol e de CO_2? A conversão do piruvato em etanol e CO_2 é essencial? Por quê? Identifique a hexose difosfato que se acumula. Por que ocorre esse acúmulo?

(c) Por que a substituição do fosfato por arsenato impede o acúmulo da hexose difosfato, enquanto permite que a fermentação até CO_2 e etanol seja completa? (veja o Problema 11.)

13. Papel metabólico da vitamina niacina. Pessoas adultas empenhadas em atividades físicas intensas requerem, para nutrição ótima, a ingestão diária de aproximadamente 160g de carboidratos mas apenas perto de 20mg de niacina. Dado o papel da niacina na glicólise, como você explica essa observação?

14. Concentração celular da glicose. A concentração da glicose no plasma do sangue humano é mantida ao redor de 5mM. A concentração da glicose livre no interior dos miócitos é muito menor. Qual razão dessa concentração ser menor? O que acontece com a glicose assim que penetra nas células? Em certas situações médicas a glicose é administrada intravenosamente para nutrir pacientes. Como a transformação da glicose em glicose-6-fosfato consome ATP, por que não administrar diretamente a glicose-6-fosfato na veia dessas pessoas?

15. Metabolismo do glicerol. O glicerol (veja a seguir) obtido da quebra das gorduras é metabolizado pela conversão em diidroxiacetona fosfato, um intermediário na glicólise, por meio de duas reações catalisadas enzimaticamente. Proponha uma seqüência de reações para o metabolismo do glicerol. Em que reações catalisadas enzimaticamente conhecidas a sua proposta está baseada? Apoiado em seu esquema, escreva a equação líquida para conversão de glicerol em piruvato.



$$HOCH_2-\overset{\displaystyle OH}{\underset{\displaystyle H}{C}}-CH_2OH$$

Glicerol

16. Medidas das concentrações intracelulares de metabólitos. Para conseguirmos medir a concentração de intermediários metabólicos na célula viva devemos superar um problema experimental difícil. Como as enzimas celulares catalisam as interconversões metabólicas de forma muito rápida, um problema comum associado com a perturbação experimental das células é que as concentrações medidas dos metabólitos representam as concentrações de equilíbrio e não as concentrações fisiológicas. Assim, uma técnica experimental confiável requer que todas as reações enzimaticamente catalisadas sejam detidas instantaneamente, ainda no tecido intacto, de tal forma que os intermediários metabólicos não sofram variação de concentração. Esse objetivo é conseguido pela compressão rápida do tecido entre grandes lâminas de alumínio resfriadas com nitrogênio líquido (−190°C), um processo chamado de **clampagem a frio**. Depois do congelamento, que detém a ação enzimática instantaneamente, o tecido é pulverizado e as enzimas são inativadas pela precipitação com ácido perclórico, o precipitado é removido por centrifugação e o extrato sobrenadante límpido é analisado em seu conteúdo de metabólitos. Para calcular as concentrações intracelulares reais dos metabólitos na célula, o volume intracelular é determinado a partir do conteúdo total de água do tecido e uma medida do volume extracelular.

As concentrações intracelulares reais dos substratos e produtos envolvidos na fosforilação da frutose-6-fosfato pela enzima fosfofrutoquinase-1 no tecido cardíaco do rato são dadas na tabela a seguir.

Metabólito	Concentração (mM)*
Frutose-6-fostato	0,087
Frutose-1,6-bifosfato	0,022
ATP	11,4
ADP	1,32

Fonte: Williamson JR. (1965) Glucolytic control mechanisms I. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated, perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **240**, 2308-2321.

* Calculado como μmol/mL de água intracelular.

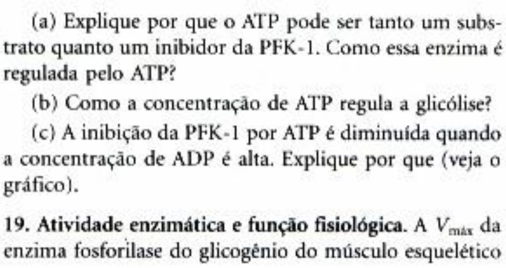
(a) Calcule a relação de ação das massas [frutose-1,6-bifosfato][ADP]/[frutose-6-fosfato][ATP], para a reação da fosfofrutoquinase-1 em condições fisiológicas.

(b) Dado que $\Delta G'^{\circ}$ para a reação da fosfofrutoquinase-1 é −14,2kJ/mol, calcule a constante de equilíbrio para essa reação.

(c) Compare os valores da relação de ação das massas e K'_{eq}. A reação fisiológica está em equilíbrio? Explique. O que esse experimento diz a respeito do papel da PFK-1 como uma enzima reguladora?

17. Efeito do suprimento de O_2 na velocidade da glicólise. Os passos regulados da glicólise nas células intactas são identificados pelo estudo do catabolismo da glicose em tecidos ou órgãos íntegros. Por exemplo, o consumo de glicose pelo músculo cardíaco pode ser medido por perfundir artificialmente sangue através de um coração isolado intacto e medir a concentração de glicose antes e depois que o sangue passou através do coração. Se o sangue circulante é desoxigenado, o músculo cardíaco consome glicose de forma constante. Quando o oxigênio é adicionado ao sangue, a velocidade do consumo da glicose cai dramaticamente e, depois, estabiliza-se nessa nova velocidade. Por quê?

18. Regulação da fosfofrutoquinase-1. O efeito do ATP na enzima alostérica PFK-1 é mostrado a seguir. Para uma dada concentração de frutose-6-fosfato, a atividade de PFK-1 cresce com concentrações aumentadas de ATP, mas é atingido um ponto acima do qual aumentos na concentração de ATP provocam a inibição da enzima.



(a) Explique por que o ATP pode ser tanto um substrato quanto um inibidor da PFK-1. Como essa enzima é regulada pelo ATP?

(b) Como a concentração de ATP regula a glicólise?

(c) A inibição da PFK-1 por ATP é diminuída quando a concentração de ADP é alta. Explique por que (veja o gráfico).

19. Atividade enzimática e função fisiológica. A $V_{máx}$ da enzima fosforilase do glicogênio do músculo esquelético é muito maior que a $V_{máx}$ da mesma enzima do tecido hepático.

(a) Qual é a função fisiológica da fosforilase do glicogênio no músculo esquelético? E no tecido hepático?

(b) Por que a velocidade máxima da enzima muscular precisa ser maior que aquela da enzima do fígado?

20. Equilíbrio da reação da fosforilase do glicogênio. A fosforilase do glicogênio catalisa a remoção da glicose da molécula do glicogênio. A $\Delta G'^{\circ}$ para essa reação é 3,1kJ/mol.

(a) Calcule a razão entre $[P_i]$ e [glicose-1-fosfato] quando a reação está no equilíbrio. (Indicação: a remoção das unidades de glicose da molécula do glicogênio não muda a concentração do glicogênio.)

(b) A relação entre $[P_i]$ e [glicose-1-fosfato] medida em miócitos, quando em condições fisiológicas, tem valor maior que 100 para 1. Por que são diferentes as relações no equilíbrio e em condições fisiológicas? Qual o possível significado dessa diferença?

21. Regulação da fosforilase do glicogênio. No tecido muscular, a velocidade de conversão do glicogênio em glicose-6-fosfato é determinada pela razão entre fosforilase *a* (ativa) e fosforilase *b* (menos ativa). O que acontece com a velocidade de quebra do glicogênio quando uma preparação de tecido muscular que contém fosforilase do glicogênio é tratada com: (a) fosforilase quinase e ATP; (b) fosforilase fosfatase; (c) epinefrina?

22. Enzimas defeituosas do metabolismo dos carboidratos. A seguir são apresentados os sumários dos estudos de três casos clínicos. Para cada caso, descubra a enzima defeituosa e indique o tratamento apropriado da lista fornecida. Justifique cada uma de suas escolhas. Responda as questões contidas em cada caso estudado.

Caso A: O paciente apresenta vômitos e diarréia pouco depois de ingerir leite. Um teste de tolerância à lactose é efetuado da seguinte forma: o paciente ingere uma certa quantidade de lactose e, a seguir, tem suas concentrações sangüíneas de glicose e galactose medidas em intervalos de tempo. Nos indivíduos normais, sem intolerância à lactose, esses níveis aumentam até um máximo em, mais ou menos, uma hora e depois declinam. Explique as causas desse fato. Os níveis de glicose e galactose de um paciente não aumentam durante o teste. Explique a causa disso.

Caso B: O paciente desenvolve vômitos e diarréia depois da ingestão de leite. Seu sangue possui uma concentração baixa de glicose, mas uma concentração de açúcares redutores muito maior que a normal. Um teste com sua urina revela a presença de galactose. Por que está alto o nível de açúcares redutores no sangue? Por que a galactose aparece na urina?

Caso C: A paciente está letárgica e seu fígado aumentado de tamanho. Uma biópsia hepática revela grande quantidade de glicogênio em excesso. Ela também apresenta a glicemia abaixo dos níveis normais. Qual a causa da glicemia baixa?

Enzima defeituosa

(a) Fosfofrutoquinase-1 do músculo
(b) Fosfomanose isomerase
(c) Galactose-1-fosfato uridililtransferase
(d) Fosforilase do glicogênio hepática
(e) Triose quinase
(f) Lactase das células epiteliais do intestino
(g) Maltase das células epiteliais do intestino

Tratamento

1. Refeições freqüentes e regulares
2. Dieta livre de gorduras
3. Dieta com pouca lactose
4. Grandes doses de niacina (vitamina precursora do NAD^+)

23. Gravidade dos sintomas devidos à deficiência de enzimas. Os sintomas devidos às duas formas de galactosemia — deficiência de galactoquinase ou de UDP glicose → galactose-1-fosfato uridililtransferase — mostram diferenças radicais entre si. Embora as duas formas acarretem desconforto gástrico depois da ingestão de leite, a deficiência da segunda enzima citada acima provoca disfunções no fígado, rim, baço e cérebro, e, finalmente, morte. Quais derivados têm sua concentração aumentada no sangue e nos tecidos em cada um dois tipos de deficiência enzimática? Considerando as informações apresentadas, avalie a toxicidade relativa desses derivados.

CAPÍTULO 16

O Ciclo do Ácido Cítrico

No Capítulo 15 estudamos como as células obtêm energia (ATP) por fermentação, quebrando a glicose na ausência de oxigênio. Entretanto, para a maioria das células eucarióticas e muitas bactérias, vivendo em condições aeróbicas e oxidando os seus combustíveis orgânicos completamente até dióxido de carbono e água, a glicólise não é mais que o primeiro estágio da oxidação completa da glicose. O piruvato formado na via glicolítica não mais é reduzido a lactato, a etanol ou a qualquer outro produto de fermentação, em vez disso ele é oxidado a CO_2 e H_2O. Essa fase aeróbica do catabolismo é chamada de **respiração**. No sentido fisiológico amplo, ou macroscópico, a palavra respiração nomeia as trocas gasosas feitas por um organismo multicelular, ou seja, a captação de O_2 e a eliminação de CO_2. Entretanto, os bioquímicos e os biólogos celulares empregam o termo em um sentido microscópico e referem-se aos processos moleculares que envolvem o consumo de O_2 e a formação de CO_2 pelas células — processos que devem, com maior precisão, ser denominados **respiração celular**.

A respiração celular ocorre em três grandes estágios (Fig. 16-1). No primeiro estágio, as moléculas dos combustíveis orgânicos — glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos — são oxidadas para liberar fragmentos de dois átomos de carbono na forma de um grupo acetil do acetil-coenzima A (acetil-CoA). No segundo estágio, esses grupos acetil são introduzidos no ciclo do ácido cítrico, o qual os oxida enzimaticamente até CO_2. A energia liberada pela oxidação é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos, NADH e $FADH_2$. No terceiro estágio da respiração, esses coenzimas reduzidos são oxidados, desfazendo-se de prótons (H^+) e elétrons. Os elétrons são conduzidos ao longo de uma cadeia de moléculas transportadoras de elétrons, conhecida como cadeia respiratória, até o O_2, o qual eles reduzem para formar H_2O. Durante esse processo de transferência de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, por meio do processo chamado de fosforilação oxidativa. A respiração é mais complexa que a glicólise e acredita-se ter surgido muito mais tarde no processo evolucionário, somente após o aparecimento das cianobactérias. A atividade metabólica dessas cianobactérias foi responsável pelo aumento da concentração do oxigênio na atmosfera da Terra, um fato dramático e decisivo na história da evolução biológica.

Este capítulo se inicia com a conversão do piruvato em grupos acetil, seguida pela entrada destes no **ciclo do ácido cítrico**, também chamado de ciclo dos **ácidos tricarboxílicos** ou **ciclo de Krebs** (Sir Hans Krebs, depois de sua descoberta). Examinaremos as reações do ciclo e as enzimas que as catalisam. Devido ao fato de os intermediários do ciclo do ácido cítrico também serem empregados como precursores biossintéticos, vamos considerar algumas vias pelas quais esses intermediários são repostos. O ciclo do ácido cítrico é uma região central do metabolismo, com vias degradativas chegando até ele e com vias anabóli-

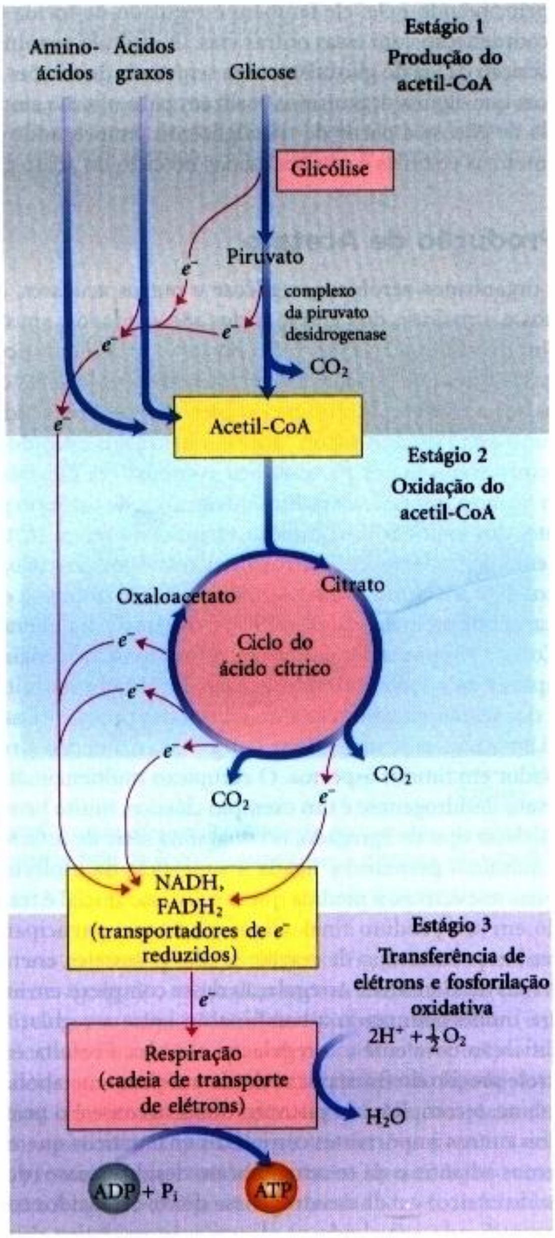


Figura 16-1 – O catabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos nos três estágios da respiração celular. Estágio 1: a oxidação dos ácidos graxos, glicose e alguns aminoácidos libera acetil-CoA. Estágio 2: a oxidação dos grupos acetil por meio do ciclo do ácido cítrico inclui quatro passos, durante os quais ocorre a retirada dos elétrons. Estágio 3: os elétrons transportados por NADH e $FADH_2$ são introduzidos na cadeia de transportadores de elétrons no interior das mitocôndrias (nas bactérias os transportadores estão ligados à membrana plasmática), a cadeia respiratória, ao final da qual o O_2 é reduzido a H_2O. Esse fluxo de elétrons fornece energia para síntese de ATP.

Hans Krebs
(1900-1981)

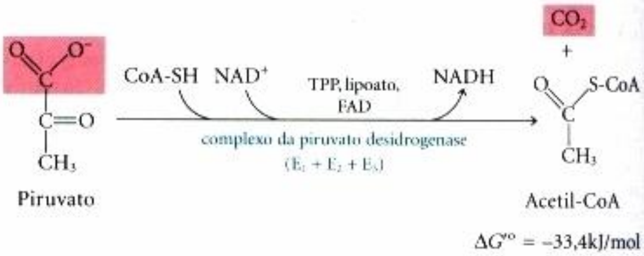


Figura 16-2 – A reação global catalisada pelo complexo da piruvato desidrogenase. No texto são discutidas as cinco coenzimas envolvidas neste conjunto de reações e as três enzimas que compõem o complexo.

cas principiando nele; ele também é regulado de forma estrita em coordenação com essas outras vias. O capítulo termina com a descrição da via do glioxalato, uma seqüência de reações metabólicas que alguns organismos realizam para obter a síntese líquida de glicose a partir de triacilgliceróis, empregando várias das mesmas enzimas e reações usadas no ciclo do ácido cítrico.

A Produção de Acetato

Nos organismos aeróbicos, a glicose e outros açúcares, ácidos graxos e a maioria dos aminoácidos são oxidados, em última instância, a CO_2 e H_2O por meio do ciclo do ácido cítrico. Entretanto, antes que possam entrar no ciclo, os esqueletos carbônicos dos açúcares e ácidos graxos precisam ser degradados até o grupo acetil do acetil-CoA, a forma na qual o ciclo do ácido cítrico recebe a maior parte de seu combustível. Também entram no ciclo por essa via muitos dos átomos de carbono provenientes dos aminoácidos, embora vários deles sejam metabolicamente degradados em outros intermediários do ciclo. Aqui vamos estudar como o piruvato, derivado da glicose e outros açúcares por meio da via glicolítica, é oxidado para liberar acetil-CoA e CO_2 por um conjunto estruturado de três enzimas, o **complexo da piruvato desidrogenase**, localizado na mitocôndria das células eucarióticas e no citosol das procarióticas.

Um exame cuidadoso desse complexo enzimático é recompensador em muitos aspectos. O complexo multienzimático da piruvato desidrogenase é um exemplo clássico, muito bem estudado, desse tipo de agregado, no qual uma série de intermediários químicos permanece ligada à superfície da molécula das enzimas respectivas, à medida que o substrato inicial é transformado em seu produto final. Cinco co-fatores participam dos mecanismos desse tipo de reação, sendo, todos eles, coenzimas derivadas de vitaminas. A regulação desse complexo enzimático ilustra muito bem como a combinação entre a regulação por modificação covalente e a regulação alostérica resulta em um controle preciso do fluxo por meio de um passo metabólico. Finalmente, o complexo da piruvato desidrogenase é o protótipo de dois outros importantes complexos enzimáticos que encontraremos adiante: o da α-cetoglutarato desidrogenase (do ciclo do ácido cítrico) e o da desidrogenase dos α-cetoácidos com cadeia ramificada, envolvida na degradação oxidativa de vários aminoácidos (veja Fig. 18-27). A notável similaridade na estrutura protéica, requerimento de co-fatores e mecanismo de reação desses três complexos refletem, indubitavelmente, uma origem evolucionária comum.

O piruvato é oxidado a acetil-CoA e CO_2

A reação completa catalisada pelo complexo da piruvato desidrogenase é a **descarboxilação oxidativa**, um processo irreversível de oxidação no qual o grupo carboxila é removido do piruvato na forma de uma molécula de CO_2 e os dois carbonos remanescentes tornam-se o grupo acetil do acetil-CoA (Fig. 16-2). O NADH formado nessa reação cede um íon hidreto ($:H^-$), com seus dois elétrons, para a cadeia respiratória (Fig. 16-1), que transporta esses elétrons até o oxigênio ou, nos microrganismos anaeróbicos, para um receptor alternativo de elétrons, como por exemplo o sulfato ou o nitrato. Em última instância, essa transferência do NADH para o oxigênio gera 2,5 moléculas de ATP por par de elétrons transportados.

A irreversibilidade da reação da piruvato desidrogenase foi provada por experimentos de marcação isotópica: o CO_2 marcado radioativamente não pode ser religado ao acetil-CoA para produzir o piruvato marcado no grupo carboxila.

O complexo da piruvato desidrogenase requer cinco coenzimas

A desidrogenação e a descarboxilação combinadas do piruvato em acetil-CoA (Fig. 16-2) envolvem a ação seqüencial de três diferentes enzimas, assim como de cinco diferentes coenzimas ou grupos prostéticos — tiamina pirofosfato (TPP), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), coenzima A (CoA), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e lipoato. Quatro vitaminas diferentes requeridas na nutrição humana são componentes vitais desse sistema: tiamina (no TPP), riboflavina (no FAD), niacina (no NAD) e pantotenato (na coenzima A).

Já descrevemos os papéis do FAD e do NAD como transportadores de elétrons (Capítulo 14) e encontramos o TPP como a coenzima da enzima que, na fermentação alcoólica, catalisa a descarboxilação do piruvato até acetaldeído (veja Fig. 15-9). O pantotenato, presente em todos os organismos vivos, é um componente essencial da coenzima A (Fig. 16-3). A coenzima A tem um grupo reativo tiol (—SH) que é crítico para o seu papel como transportadora de grupos acila em um grande número de reações metabólicas; os grupos acila ligam-se covalentemente a esse grupo tiol, formando **tioésteres**. Devido à sua energia livre de hidrólise relativamente alta (veja Figs. 14-6 e 14-7), os tioésteres têm um alto potencial de transferência de grupos acila, doando esses grupos a uma grande variedade de moléculas receptoras. O grupo acila ligado à coenzima A pode, assim, ser visto como um estado ativado para transferência do mesmo grupo.

O quinto co-fator para a reação catalisada pela piruvato desidrogenase, o **lipoato** (Fig. 16-4), tem dois grupos tióis, ambos essenciais para o papel que desempenham como co-fator. Na forma reduzida do lipoato, os dois átomos de enxofre estão presentes como grupos —SH, mas que por oxidação reversível formam uma ligação dissulfeto (—S—S—), similar àquela existente entre dois resíduos de cisteína encontrados em proteínas. Devido a essa sua capacidade de sofrer reações de oxidação-redução, o lipoato pode servir tanto como transportador de elétrons quanto como de grupos acila, como veremos adiante.

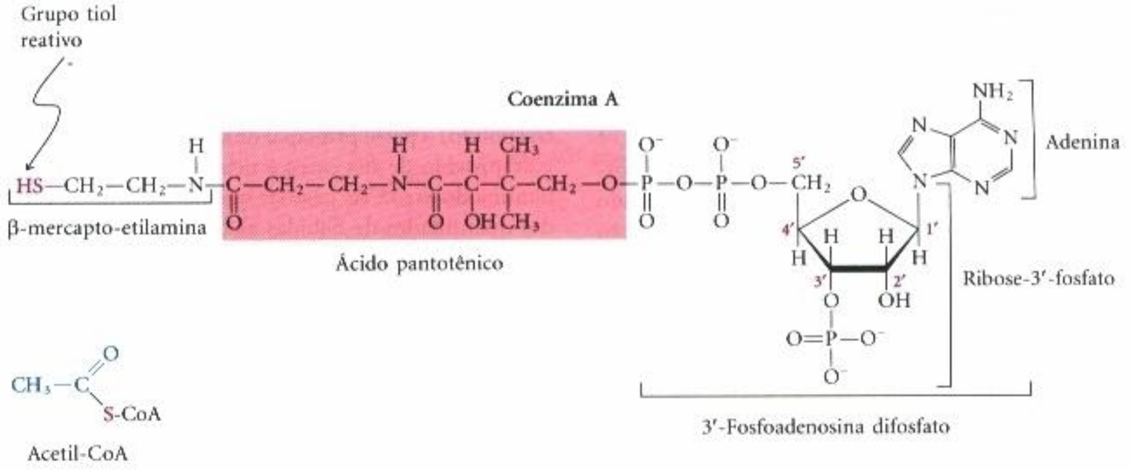

Grupo tiol reativo
Coenzima A
HS—CH₂—CH₂—N
β-mercapto-etilamina
Ácido pantotênico
Adenina
Ribose-3'-fosfato
3'-Fosfoadenosina difosfato
CH₃—C—S-CoA
Acetil-CoA

Figura 16-3 – Coenzima A (CoA). Um grupo hidroxila do ácido pantotênico junta-se a uma porção modificada do ADP por meio de uma ligação de éster fosfórico e o seu grupo carboxila é ligado na β-mercapto-etilamina por meio de uma ligação amida. O grupo hidroxila na posição 3' da porção de ADP tem um grupo fosforil que não está presente no próprio ADP. O grupo —SH da porção de mercapto-etilamina forma um tioéster com o acetato do acetil-CoA (embaixo à esquerda).

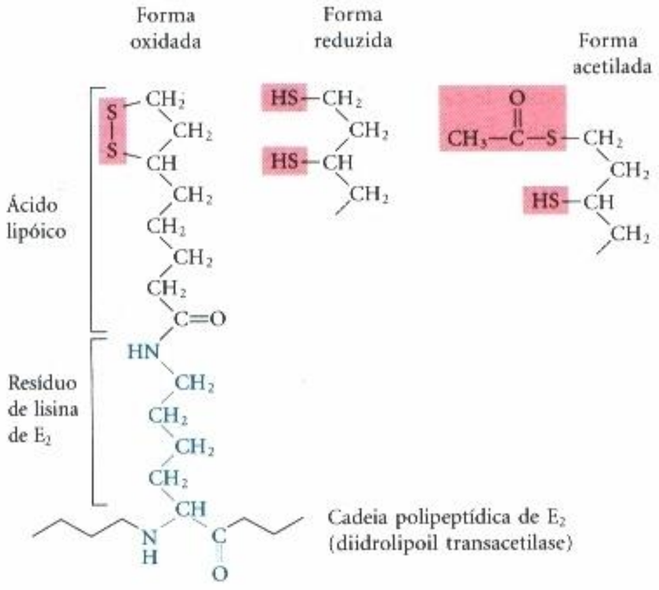

Forma oxidada
Forma reduzida
Forma acetilada
Ácido lipóico
Resíduo de lisina de E₂
Cadeia polipeptídica de E₂ (diidrolipoil transacetilase)

Figura 16-4 – O ácido lipóico (lipoato) em ligação amida com a cadeia lateral de um resíduo de lisina. A porção lipoil-lisil é o grupo prostético da diidrolipoil transacetilase (E_2 do complexo da piruvato desidrogenase). O grupo lipoil existe tanto na forma oxidada (dissulfeto) quanto na reduzida (ditiol) e pode agir quer como um transportador de hidrogênio quer como um transportador de grupos acetil (ou outros grupos acila).

O complexo da piruvato desidrogenase consiste em três enzimas distintas

O complexo da piruvato desidrogenase contém três enzimas: a **piruvato desidrogenase** (E_1), a **diidrolipoil transacetilase** (E_2) e a **diidrolipoil desidrogenase** (E_3), cada uma delas presente em múltiplas cópias. O número de cópias de cada subunidade e, portanto, o tamanho do complexo variam de um organismo para outro. O complexo da piruvato desidrogenase isolado da *Escherichia coli* ($M_r > 4{,}5 \times 10^6$) tem perto de 45nm de diâmetro, um pouquinho maior que um ribossomo e pode ser visualizado em microscópios eletrônicos (Fig. 16-5). A porção central desse agregado, ao qual as outras enzimas estão ligadas, é constituída por cópias de diidrolipoil transacetilase (E_2). No complexo da *E. coli*, 24 cópias dessa cadeia polipeptídica, cada uma delas contendo três moléculas de lipoato ligado covalentemente, constituem essa região central. No complexo de mamíferos existem 60 cópias da E_2 e seis de uma proteína relacionada, proteína X, que também contém lipoato ligado covalentemente. A ligação do lipoato às extremidades de cadeias laterais de lisina em E_2 produz braços longos e flexíveis que podem transportar os grupos acetil de um sítio ativo para outro no interior do complexo da piruvato desidrogenase. Na *E. coli*, ligadas a essa parte central de moléculas E_2, existem vinte e quatro cópias da piruvato desidrogenase (E_1) e doze cópias da diidrolipoil desidrogenase (E_3). A E_1 contém TPP ligado e a E_3 contém FAD ligado. Duas proteínas reguladoras, uma proteína quinase e uma fosfoproteína fosfatase, também fazem parte do complexo da piruvato desidrogenase. Suas funções serão descritas adiante.

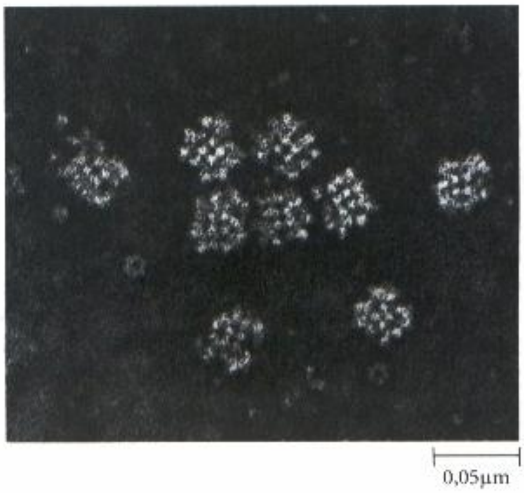


Figura 16-5 – Microfotografia eletrônica do complexo da piruvato desidrogenase isolado da *E. coli*, mostrando sua estrutura em subunidades.

Os intermediários permanecem ligados à superfície das enzimas

A Figura 16-6 mostra esquematicamente como o complexo da piruvato desidrogenase desenvolve as cinco reações consecutivas na descarboxilação e desidrogenação do piruvato. O passo ① é essencialmente idêntico à reação catalisada pela piruvato descarboxilase (veja Fig. 15-9c); o C-1 do piruvato é liberado como CO_2 e o C-2, que no piruvato tem o estado de oxidação de um aldeído, é ligado ao TPP como um grupo hidroxietil. No passo ②, esse grupo é oxidado a um ácido carboxílico (acetato). Os dois elétrons removidos na reação de oxidação reduzem a ligação —S—S— de um grupo lipoil em E_2 a dois grupos tióis (—SH). O acetato produzido nessa reação de oxidação-redução é primeiro esterificado a um dos dois grupos —SH do lipoil, então transesterificado a CoA para formar acetil-CoA (passo ③). Assim, a energia da oxidação impulsiona a formação de um tioéster de acetato de alta energia. As reações restantes catalisadas pelo complexo da piruvato desidrogenase (passos ④ e ⑤) são transferências de elétrons necessárias para a regeneração da forma dissulfeto do grupo lipoil de E_2, preparando, assim, o complexo enzimático para outra rodada de oxidação. Os elétrons removidos do grupo hidroxietil derivado do piruvato passam por meio do FAD para o NADH.

Em posição central nesse processo estão os braços móveis lipoilisil de E_2, em que passam os dois elétrons e o grupo acetil, derivados do piruvato de E_1 para E_3. Todas essas enzimas e coenzimas estão agregadas, permitindo que os intermediários reajam rapidamente sem jamais abandonarem a superfície do complexo enzimático. A seqüência de cinco reações mostrada na Figura 16-6 é um outro exemplo de canalização de substratos (veja Fig. 15-8).

Como é facilmente previsível, são severas as conseqüências de mutações nos genes das subunidades da piruvato desidrogenase ou de deficiência de tiamina na alimentação. Animais deficientes em tiamina são incapazes de oxidar normalmente o piruvato, isso é de importância especial no cérebro; normalmente esse órgão obtém toda a sua energia pela oxidação aeróbica da glicose e, portanto, a oxidação do piruvato é vital. O beribéri, uma doença que resulta da deficiência dietética de tiamina, é caracterizado pela perda parcial de funções neurais. Essa doença ocorre principalmente em populações que fazem do arroz branco (polido) a parte principal de sua alimentação; o arroz branco é desprovido de sua casca e nela se encontra a maior parte da tiamina do arroz. As pessoas que habitualmente ingerem grandes quantidades de bebidas alcoólicas também podem desenvolver carência de tiamina; isso porque a maior parte de sua ingestão alimentar passa a ser na forma de "calorias vazias" das bebidas destiladas (desprovida de vitaminas e outros nutrientes essenciais). Freqüentemente, um elevado nível de piruvato no sangue é um indicador de falhas em sua oxidação devido a uma dessas causas.

Reações do Ciclo do Ácido Cítrico

Estamos prontos para examinar a forma pela qual o acetil-CoA sofre oxidação. Essa transformação química ocorre no ciclo do ácido cítrico, a primeira via *cíclica* que encontramos (Fig. 16-7). Para iniciar uma volta do ciclo, o acetil-CoA transfere o seu grupo acetil para um composto com quatro átomos de carbono, o oxaloacetato, para formar o citrato, um composto com seis átomos de carbono. O citrato é então transformado em isocitrato, também uma molécula de seis átomos de carbono, e este é desidrogenado, com perda de CO_2, para formar o composto com cinco átomos de carbono α-cetoglutarato (também chamado oxoglutarato). Este último também perde CO_2 e libera o succinato, um composto com quatro átomos de carbono. O succinato é convertido enzimaticamente, em uma reação de três passos, no oxaloacetato com quatro átomos de carbono, com o qual o ciclo se iniciou; assim, o oxaloacetato está pronto para reagir com uma nova molécula de acetil-CoA e iniciar uma segunda volta do ciclo. Em cada uma dessas voltas entra um grupo acetil (dois carbonos), como acetil-CoA, e saem duas moléculas de CO_2. Em cada volta, uma molécula de oxaloacetato é empregada

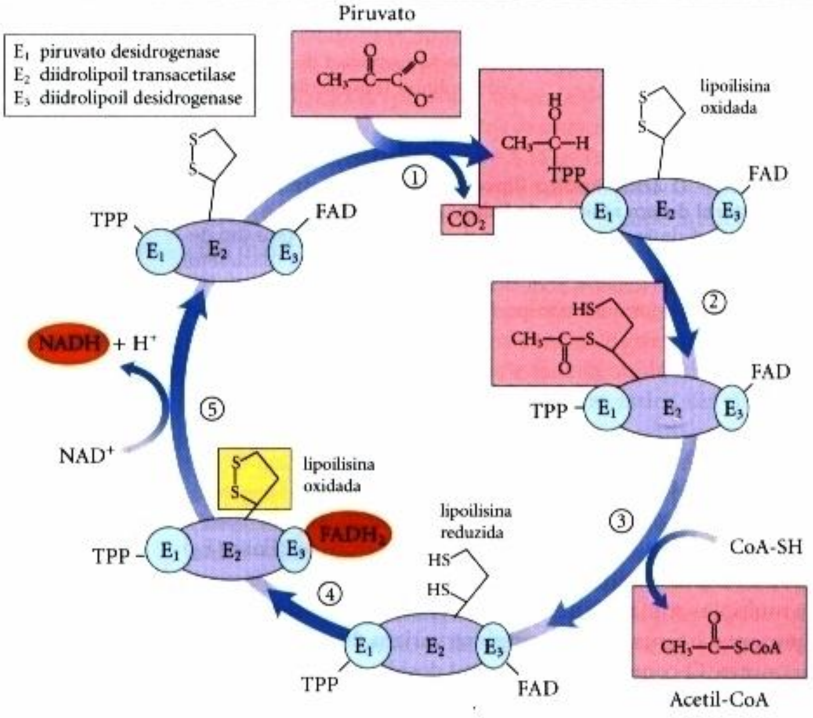


Figura 16-6 – Descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA pelo complexo da piruvato desidrogenase. O destino do piruvato está marcado em rosa. No passo ①, o piruvato reage com a tiamina pirofosfato (TPP) ligada na piruvato desidrogenase (E_1), sofrendo descarboxilação para formar o derivado hidroxietil. A piruvato desidrogenase também catalisa o passo ②, a transferência de dois elétrons do grupo acetil do TPP para a forma oxidada do grupo lipoilisil da porção central da enzima, diidrolipoil transacetilase (E_2), para formar o acetil-tioéster do grupo lipoil reduzido. O passo ③ é a transesterificação em que o grupo —SH da CoA substitui o grupo —SH de E_2 para liberar acetil-CoA e a forma totalmente reduzida (ditiol) do grupo lipoil. No passo ④, a diidrolipoil desidrogenase (E_3) promove a transferência de dois átomos de hidrogênio dos grupos lipoil reduzidos de E_2 para o grupo prostético FAD de E_3, restaurando a forma oxidada do grupo lipoilisil de E_2 (sombreado amarelo). No passo ⑤ o grupo reduzido $FADH_2$ em E_3 transfere um íon hidreto para o NAD^+, formando NADH. O complexo enzimático está agora pronto para outro ciclo catalítico.

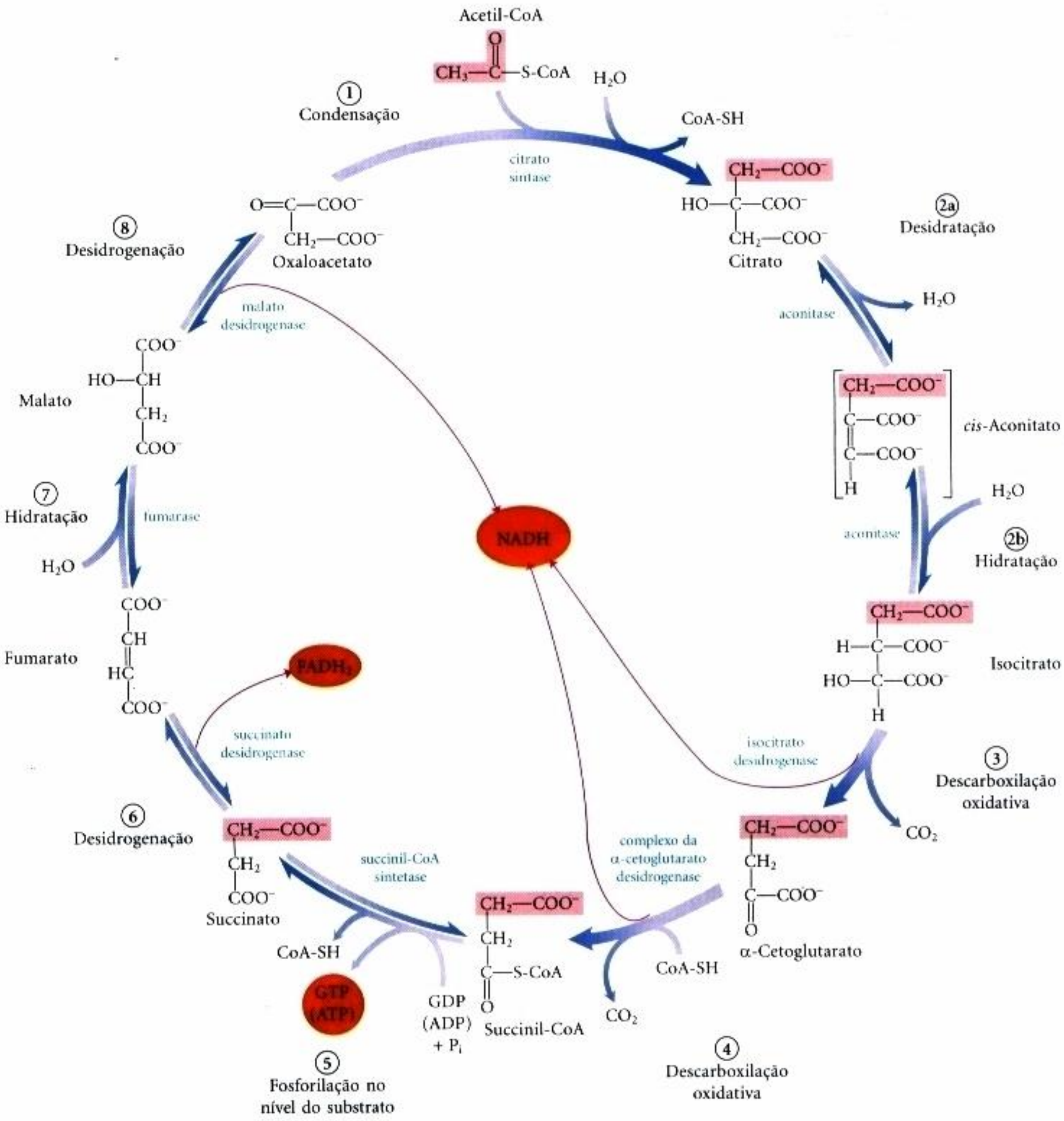

Acetil-CoA
CH₃—C(=O)—S-CoA
H₂O
① Condensação
CoA-SH
citrato sintase
CH₂—COO⁻
HO—C—COO⁻
CH₂—COO⁻
Citrato
②a Desidratação
aconitase
H₂O
⑧ Desidrogenação
O=C—COO⁻
CH₂—COO⁻
Oxaloacetato
malato desidrogenase
COO⁻
HO—CH
CH₂
COO⁻
Malato
CH₂—COO⁻
C—COO⁻
C—COO⁻
H
cis-Aconitato
H₂O
aconitase
②b Hidratação
⑦ Hidratação
fumarase
H₂O
NADH
COO⁻
CH
HC
COO⁻
Fumarato
FADH₂
CH₂—COO⁻
H—C—COO⁻
HO—C—COO⁻
H
Isocitrato
succinato desidrogenase
isocitrato desidrogenase
③ Descarboxilação oxidativa
CO₂
⑥ Desidrogenação
CH₂—COO⁻
CH₂
COO⁻
Succinato
succinil-CoA sintetase
complexo da α-cetoglutarato desidrogenase
CH₂—COO⁻
CH₂
C—COO⁻
O
α-Cetoglutarato
CH₂—COO⁻
CH₂
C—S-CoA
O
Succinil-CoA
CoA-SH
CoA-SH
GTP (ATP)
GDP (ADP) + Pᵢ
CO₂
⑤ Fosforilação no nível do substrato
④ Descarboxilação oxidativa

Figura 16-7 – As reações do ciclo do ácido cítrico. Os átomos de carbono sombreados em vermelho são aqueles que derivam do acetato do acetil-CoA na primeira volta do ciclo. Esses carbonos *não* são aqueles liberados como CO_2 na primeira volta. Note que os grupos de dois átomos de carbono derivados do acetato não podem mais ser distinguidos especificamente no fumarato; isso porque o succinato e o fumarato são moléculas simétricas e, portanto, C-1 e C-2 são indistinguíveis de C-4 e C-3. O número ao lado de cada passo da reação corresponde à numeração dos subtítulos descritos no texto. As setas vermelhas indicam onde a energia é conservada pela transferência de elétrons para o FAD ou o NAD^+, formando o $FADH_2$ ou NADH + H^+. Os passos ①, ③ e ④ são essencialmente irreversíveis na célula; todos os outros são reversíveis. O produto do passo ⑤ pode ser o ATP ou o GTP, dependendo de qual das isozimas da succinil-CoA sintetase participa da catálise.

para formar citrato, mas — depois de uma série de reações — essa molécula de oxaloacetato é regenerada. Não ocorre, portanto, qualquer remoção final de oxaloacetato e uma molécula dele pode, teoricamente, ser suficiente para participar da oxidação de um número infinito de grupos acetil e, de fato, nas células o oxaloacetato está presente em concentrações muito pequenas. Quatro dos oito passos desse processo são oxidações e a energia nelas liberada é conservada, com alta eficiência, na formação dos coenzimas reduzidos (NADH e $FADH_2$).

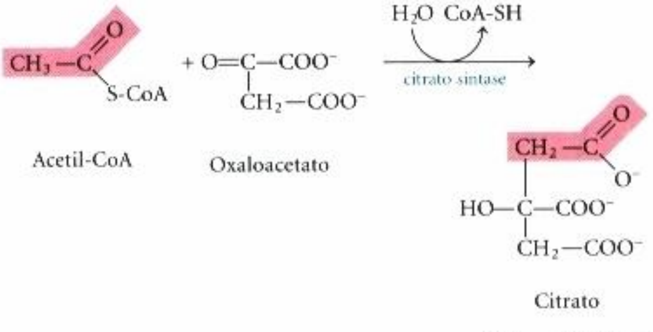
Como já explicamos anteriormente, embora o ciclo do ácido cítrico tenha um papel central nos mecanismos metabólicos de obtenção de energia, seu papel não está limitado à conservação dessa energia. Intermediários com quatro e cinco átomos de carbono do ciclo são empregados como precursores biossintéticos de uma grande variedade de substâncias. Para substituir as moléculas desses intermediários removidos com esse propósito, as células empregam as reações anapleróticas (reações de reposição), as quais serão descritas logo mais.

Em 1948, Eugene Kennedy e Albert Lehninger demonstraram que o conjunto inteiro de reações do ciclo do ácido cítrico está localizado no interior da mitocôndria. Foi demonstrado que mitocôndrias separadas de todos os demais componentes celulares possuíam não só todas as enzimas e coenzimas necessárias para o ciclo do ácido cítrico, mas também todas as enzimas e proteínas necessárias para o último estágio da respiração, ou seja, a transferência de elétrons e a síntese de ATP por fosforilação oxidativa. Como veremos em capítulos posteriores, as mitocôndrias também contêm as enzimas que catalisam a oxidação dos ácidos graxos em acetil-CoA e a degradação oxidativa dos aminoácidos em acetil-CoA ou, para alguns aminoácidos, α-cetoglutarato, succinil-CoA ou oxaloacetato. Assim, nos eucariotos não-fotossintéticos, a mitocôndria é o lugar onde ocorre a maioria das reações oxidativas liberadoras de energia e a síntese do ATP acoplada a essas reações. Nos eucariotos fotossintéticos, quando em ambiente escuro, a mitocôndria é o principal local de produção de ATP, mas sob a luz do dia os cloroplastos produzem a maior quantidade de ATP do organismo. A maioria dos procariotos contém as enzimas do ciclo do ácido cítrico em seu citosol e a sua membrana plasmática desempenha um papel análogo àquele da membrana mitocondrial interna na síntese de ATP (Capítulo 19).

O ciclo do ácido cítrico possui oito passos

A seguir examinaremos as oito reações sucessivas do ciclo do ácido cítrico e colocaremos ênfase especial no estudo das transformações químicas que ocorrem à medida que o acetil-CoA é oxidado para liberar CO_2 e a energia oriunda dessa oxidação é conservada na forma das coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$.

① **Formação do citrato.** A primeira reação do ciclo é a condensação do acetil-CoA com o **oxaloacetato** para formar **citrato**, catalisado pela **citrato sintase**:

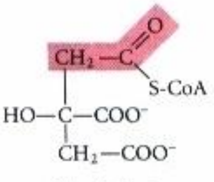


$$CH_3{-}C(=O){-}S\text{-}CoA + O{=}C(COO^-){-}CH_2{-}COO^- \xrightarrow[\text{citrato sintase}]{H_2O\ \ CoA\text{-}SH} CH_2(COO^-){-}C(OH)(COO^-){-}CH_2{-}COO^-$$

Acetil-CoA Oxaloacetato Citrato

$\Delta G'^{\circ} = -32{,}2\text{kJ/mol}$

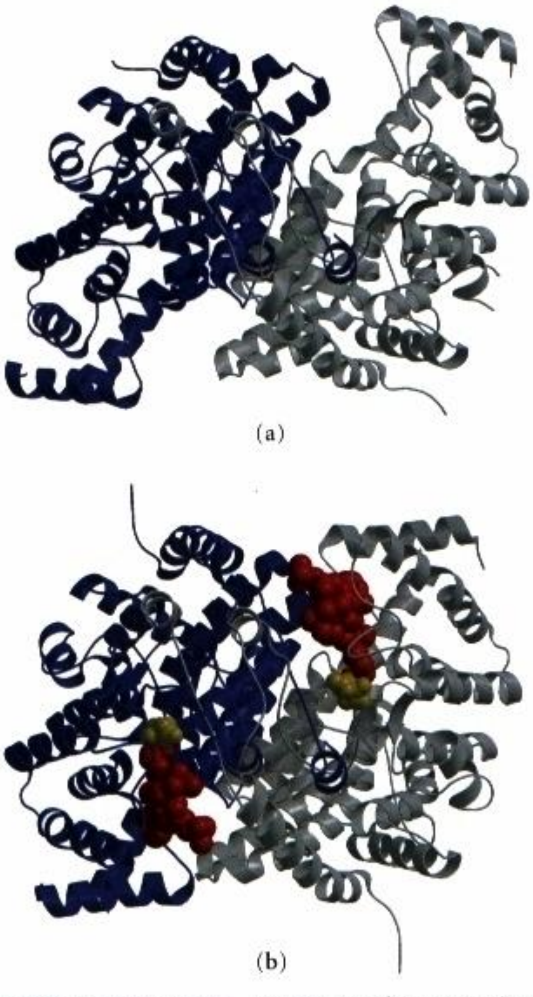
Nesta reação o carbono metila do grupo acetil é reunido ao grupo carbonila (C-2) do oxaloacetato. O intermediário citroil-CoA é transitório; ele é formado no sítio ativo da enzima e é rapidamente hidrolisado, liberando o citrato e a CoA livre, estes últimos abandonam o sítio ativo. A hidrólise do tioéster intermediário de alta energia faz com que a reação seja altamente exergônica nesse sentido. A variação de energia livre negativa e de grande valor absoluto, associada com a reação da citrato sintase, é essencial para a operação do ciclo, isso porque, normalmente, a concentração de oxaloacetato presente é muito baixa. A CoA deixada livre nesta reação é reciclada; ela pode vir a participar de várias reações em que atua, inclusive na descarboxilação oxidativa de outra molécula de piruvato pelo complexo da piruvato desidrogenase para formar outra molécula de acetil-CoA, que, por sua vez, entrará também no ciclo.



$$CH_2(C(=O){-}S\text{-}CoA){-}C(OH)(COO^-){-}CH_2{-}COO^-$$

Citroil-CoA

A citrato sintase da mitocôndria já foi cristalizada e visualizada por cristalografia de raios X na presença e na ausência de seus substratos e inibidores (Fig. 16-8). O oxaloacetato, o primeiro substrato a ligar-se nela, induz a uma mudança conformacional que faz aparecer um sítio de ligação para o segundo substrato, o acetil-CoA. Quando o citroil-CoA se forma na superfície da enzima, outra mudança conformacional traz a cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico essencial em posição adequada para clivar o tioéster. Esse ajuste induzido da enzima, primeiro em relação a seu substrato e logo após a seu intermediário, diminui a possibilidade de uma clivagem prematura e improdutiva da ligação tioéster do acetil-CoA.

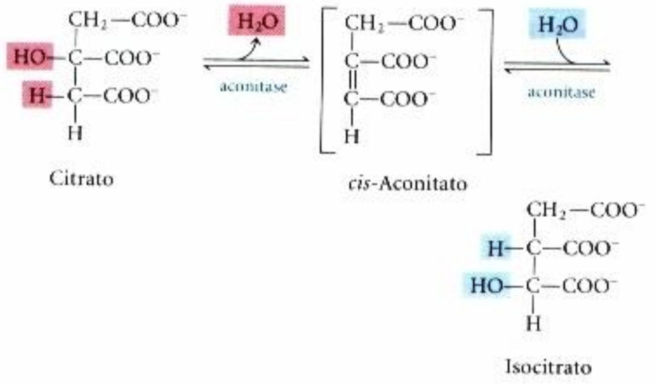


(a)

(b)

Figura 16-8 – Citrato sintase. Esta enzima sofre uma mudança conformacional grande quando se liga ao oxaloacetato: (**a**) forma aberta da enzima sozinha; (**b**) forma fechada quando ligada com o oxaloacetato (amarelo) e um análogo estável do acetil-CoA (carboximetil-CoA; vermelho).

② **Formação do isocitrato via *cis*-aconitato.** A enzima **aconitase** (mais formalmente, **aconitato hidratase**) catalisa a transformação reversível do citrato em **isocitrato**, por meio da formação intermediária do ***cis*-aconitato**, um ácido tricarboxílico que, normalmente, não se dissocia do sítio ativo. A aconitase pode promover a adição reversível de água na dupla ligação do *cis*-aconitato ligado no sítio catalítico da enzima por dois caminhos diferentes, um levando a citrato e o outro a isocitrato:


CH₂—COO⁻
HO—C—COO⁻
H—C—COO⁻
H
Citrato
H₂O
aconitase
cis-Aconitato
H₂O
aconitase
H—C—COO⁻
HO—C—COO⁻
Isocitrato

$\Delta G'^{\circ} = 13{,}3\text{kJ/mol}$

Embora a mistura em equilíbrio em pH 7,4 e 25°C contenha menos que 10% de isocitrato, na célula, a reação é deslocada para a direita, porque o isocitrato é rapidamente consumido no passo subseqüente do ciclo, diminuindo a concentração de equilíbrio estacionário. A aconitase contém um **centro ferro-enxofre** (Fig. 16-9), que atua tanto na **ligação do substrato** no sítio ativo quanto na catálise da adição ou remoção de água.

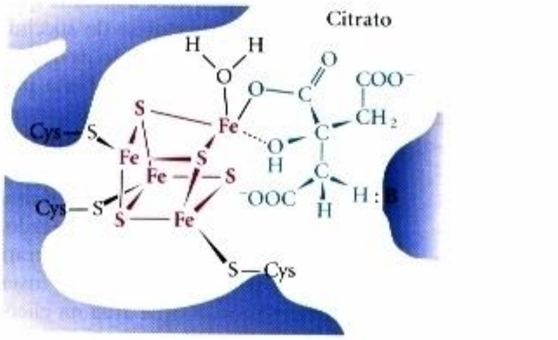
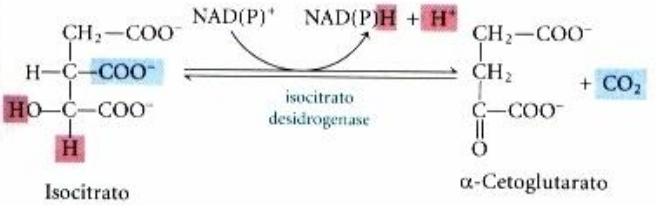

Citrato
H
H
O
O
O—C
COO⁻
CH₂
S
Cys—S
Fe
O
C
Fe
S
H
Fe
S
C
⁻OOC
H
H:B
Cys—S
S
Fe
S—Cys

Figura 16-9 – O centro de ferro-enxofre na aconitase. O centro de ferro-enxofre está em vermelho e a molécula do citrato em azul. Três resíduos de cisteína da enzima ligam-se a três átomos de ferro; o quarto átomo de ferro está ligado a um dos grupos carboxila do citrato. :B representa um resíduo básico da enzima que ajuda a posicionar o citrato no sítio ativo. O centro ferro-enxofre age em ambos processos: ligação do substrato e catálise da reação. As propriedades gerais das proteínas ferro-enxofre são discutidas no Capítulo 19 (veja Fig. 19-5).

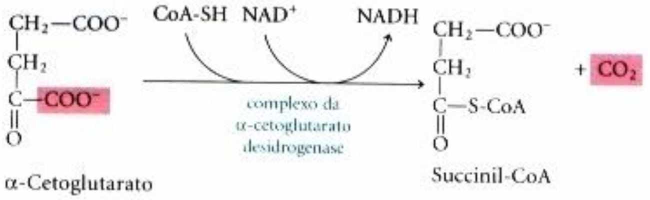
③ Oxidação do isocitrato à α-cetoglutarato e CO_2. No passo seguinte a **isocitrato desidrogenase** catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato para formar o **α-cetoglutarato**:


NAD(P)⁺
NAD(P)H + H⁺
CH₂—COO⁻
H—C—COO⁻
HO—C—COO⁻
H
Isocitrato
isocitrato desidrogenase
CH₂—COO⁻
CH₂
C—COO⁻
O
+ CO₂
α-Cetoglutarato

$\Delta G'^{\circ} = -20{,}9\text{kJ/mol}$

Existem duas formas diferentes da desidrogenase isocítrica, uma que emprega o NAD^+ como receptor de elétrons e outra que emprega o $NADP^+$. A reação global catalisada pelas duas isoenzimas é idêntica nos demais aspectos. Nas células eucarióticas, a enzima dependente de NAD é encontrada na matriz mitocondrial e atua no ciclo do ácido cítrico. A isoenzima dependente de NADP é encontrada tanto na matriz mitocondrial quanto no citosol e sua função mais importante deve ser a geração de NADPH, que é essencial nas reações anabólicas de redução.

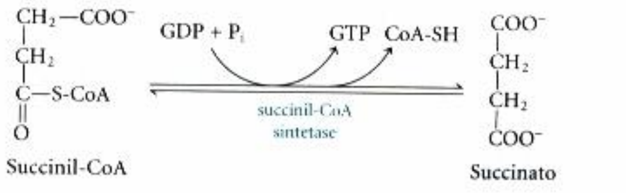
④ Oxidação do α-cetoglutarato a succinil-CoA e CO_2. O passo seguinte é outra descarboxilação oxidativa, nela o α-cetoglutarato é convertido em **succinil-CoA** e CO_2 pela ação do **complexo da desidrogenase** do **α-cetoglutarato**; o NAD^+ serve como receptor de elétrons, e o CoA, como carreador do grupo succinil. A energia de oxidação do **α-cetoglutarato** é conservada pela formação de uma ligação tioéster do succinil-CoA:


CH₂—COO⁻
CH₂
C—COO⁻
O
α-Cetoglutarato
CoA-SH
NAD⁺
NADH
complexo da α-cetoglutarato desidrogenase
CH₂—COO⁻
CH₂
C—S-CoA
O
Succinil-CoA
+ CO₂

$\Delta G'^{\circ} = -33{,}5\text{kJ/mol}$

Esta reação é virtualmente idêntica à reação da piruvato desidrogenase discutida anteriormente, e o complexo da α-cetoglutarato desidrogenase assemelha-se muito, em estrutura e em função, ao complexo da piruvato desidrogenase. Ele inclui não apenas as três enzimas análogas a E_1, E_2 e E_3 do complexo da piruvato desidrogenase, mas também TPP ligado a enzima, lipoato ligado às proteínas, FAD, NAD e à coenzima A. Embora a E_1 do complexo da α-cetoglutarato desidrogenase seja estruturalmente similar à E_1 da piruvato desidrogenase, suas seqüências de aminoácidos são diferentes e elas têm especificidades de ligação diferentes: os componentes E_1 do complexo da piruvato desidrogenase ligam-se especificamente ao piruvato, enquanto E_1 do complexo da desidrogenase do α-cetoglutarato liga-se ao α-cetoglutarato. Os componentes E_2 dos dois complexos são muito similares; ambos incluem partes de lipoil ligadas covalentemente. As subunidades de E_3, para os dois complexos, são virtualmente idênticas. É quase certo que as proteínas desses dois complexos multienzimáticos compartilhem uma origem evolutiva comum.

⑤ Conversão do succinil-CoA em succinato. Como o acetil-CoA, o succinil-CoA tem uma energia livre de hidrólise de sua ligação tioéster forte e negativa ($\Delta G'^{\circ} \approx -36\text{kJ/mol}$). No próximo passo do ciclo do ácido cítrico, a energia liberada no rompimento dessa ligação é empregada para dirigir a síntese de uma ligação de anidrido fosfórico no ATP ou no GTP, com uma $\Delta G'^{\circ}$ de apenas $-2{,}9\text{kJ/mol}$. No processo forma-se, afinal, o **succinato**:


CH₂—COO⁻
CH₂
C—S-CoA
O
Succinil-CoA
GDP + Pᵢ
GTP
CoA-SH
succinil-CoA sintetase
COO⁻
CH₂
CH₂
COO⁻
Succinato

$\Delta G'^{\circ} = -2{,}9\text{kJ/mol}$

A enzima que catalisa esta reação reversível é chamada de **succinil-CoA sintetase** ou de **tioquinase succínica**; ambos os nomes indicam a participação de um nucleosídeo trifosfato na reação (Adendo 16-1).

Esta reação conservadora de energia envolve um passo intermediário no qual a molécula da enzima é fosforilada em um resíduo de histidina específico, que está presente no sítio ativo (Fig. 16-10a). Esse grupo fosfato, que tem um alto potencial de transferência de grupo, é transferido para o ADP (ou para o GDP) com a formação de ATP (ou GTP). As células animais têm duas isozimas, uma específica para ADP e a outra para GDP. A succinil-CoA sintetase tem duas subunidades, a denominada α (M_r 32.000), a qual tem o resíduo fosfo-histidina (His^{246}) e o sítio de ligação para a CoA, e a denominada β (M_r 42.000), que confere especificidade para ATP ou GTP. O sítio ativo está na interface das duas subunidades. A estrutura cristalográfica da succinil-CoA sintetase revela duas "hélices de força" (uma para cada subunidade) orientadas de forma que seus dipolos elétricos coloquem cargas parciais positivas perto do grupo fosfo-histidina carregado negativamente (Fig. 16-10b), estabilizando o intermediário fosfoenzima. (Lembre-se do papel similar das "hélices dipolares" estabilizando os íons potássio no canal de K^+; veja Fig. 12-38.)

A síntese de ATP (ou GTP) às expensas da energia liberada pela descarboxilação oxidativa do α-cetoglutarato é outro exemplo de fosforilação no nível do substrato, como a síntese de ATP acoplada às reações na glicólise catalisadas pelas enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e piruvato quinase (veja Fig. 15-2).

Adendo 16-1 Sintases e sintetases; ligases e liases; quinases, fosfatases e fosforilases: Ufa! Tantos nomes realmente confundem!

A citrato sintase é uma das muitas enzimas que catalisam reações de condensação, produzindo um produto quimicamente mais complexo que seus precursores. As **sintases** catalisam as reações de condensação, nas quais nenhum nucleosídeo trifosfato (ATP, GTP etc.) é necessário como fonte de energia. As **sintetases** catalisam condensações que *empregam* o ATP, ou outro nucleosídeo trifosfato, como fonte de energia para realizar a reação de síntese. A succinil-CoA sintetase é uma dessas enzimas. As **ligases** (do latim *ligare*, ou seja, "amarrar juntos") catalisam reações de condensação, nas quais dois átomos são unidos, empregando a energia do ATP ou de qualquer outra fonte de energia. (Assim, sim, sintetases são ligases.) A DNA ligase, por exemplo, fecha rupturas nas moléculas do DNA, utilizando a energia fornecida pelo ATP ou pelo NAD^+; ela é largamente empregada na engenharia genética para reunir pedaços de DNA. As ligases não devem ser confundidas com as **liases**, enzimas que catalisam clivagens (ou na direção inversa, adições), nas quais ocorrem rearranjos eletrônicos. O complexo da piruvato desidrogenase, que cliva oxidativamente o CO_2 do piruvato, está nessa grande classe de enzimas.

O nome **quinase** é aplicado àquelas enzimas que transferem um grupo fosfato de um nucleosídeo trifosfato, como o ATP, para diferentes moléculas receptoras — um açúcar (como na hexoquinase e glicoquinase), uma proteína (como na quinase da fosforilase do glicogênio), outro nucleotídeo (como na nucleosídeo difosfato quinase), ou um intermediário metabólico como o oxaloacetato (como na PEP carboxiquinase). Uma reação catalisada por uma quinase é uma *fosforilação*. Por outro lado, *fosforólise* é uma reação de deslocamento na qual o fosfato é a espécie que ataca e se torna covalentemente ligada ao ponto de quebra da ligação. Tais reações são catalisadas pelas **fosforilases**. A fosforilase do glicogênio, por exemplo, catalisa a fosforólise do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato. *Desfosforilação* é a remoção de um grupo fosforil de um éster fosfórico e é catalisada por **fosfatases**, com a água atuando como a espécie atacante. A frutose bifosfatase-1 converte a frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato na neoglicogênese e a fosforilase *a* fosfatase retira os grupos fosforil da fosfosserina na fosforilase do glicogênio fosforilada. Ufa!

Infelizmente, ocorrem sobreposições nessas descrições de tipos de enzimas e muitas delas são comumente chamadas por dois ou mais nomes. Por exemplo, a succinil-CoA sintetase é também chamada de succinato tioquinase; essa enzima possui, claramente, as duas atividades, a de uma sintetase no ciclo do ácido cítrico e a de uma quinase, quando age na direção da síntese do succinil-CoA. Isso levanta outra fonte de confusão na denominação das enzimas: uma enzima é descoberta pelo emprego de um ensaio da conversão de, digamos, A em B, e recebe um nome para essa reação, porém depois descobre-se que, na célula, ela funciona primariamente na conversão de B em A. Comumente, o primeiro nome continua a ser empregado, embora o papel metabólico da enzima seja, claramente, mais bem descrito pelo nome da reação inversa. A enzima piruvato quinase (que atua na glicólise) ilustra bem essa situação (pág. 417). Para um principiante em bioquímica, essa duplicação da nomenclatura pode criar confusão. Os comitês científicos internacionais têm feito esforços heróicos para sistematizar a nomenclatura das enzimas (veja Tabela 8-3, para um breve sumário desse sistema), mas, freqüentemente, os nomes sistemáticos delas são tão longos e enfadonhos que não são empregados na conversação bioquímica.

Ao longo deste livro procuramos utilizar, para cada enzima, o nome mais comum empregado pelos bioquímicos que mais trabalham com elas e deixar claro os casos nos quais uma dada enzima tem mais de um nome empregado com freqüência. Para informações atualizadas sobre nomenclatura das enzimas, o Web site Lehninger:

(http://www.worthpublishers.com/lehninger)

tem o endereço para acesso às recomendações do The Nomenclature Commitee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

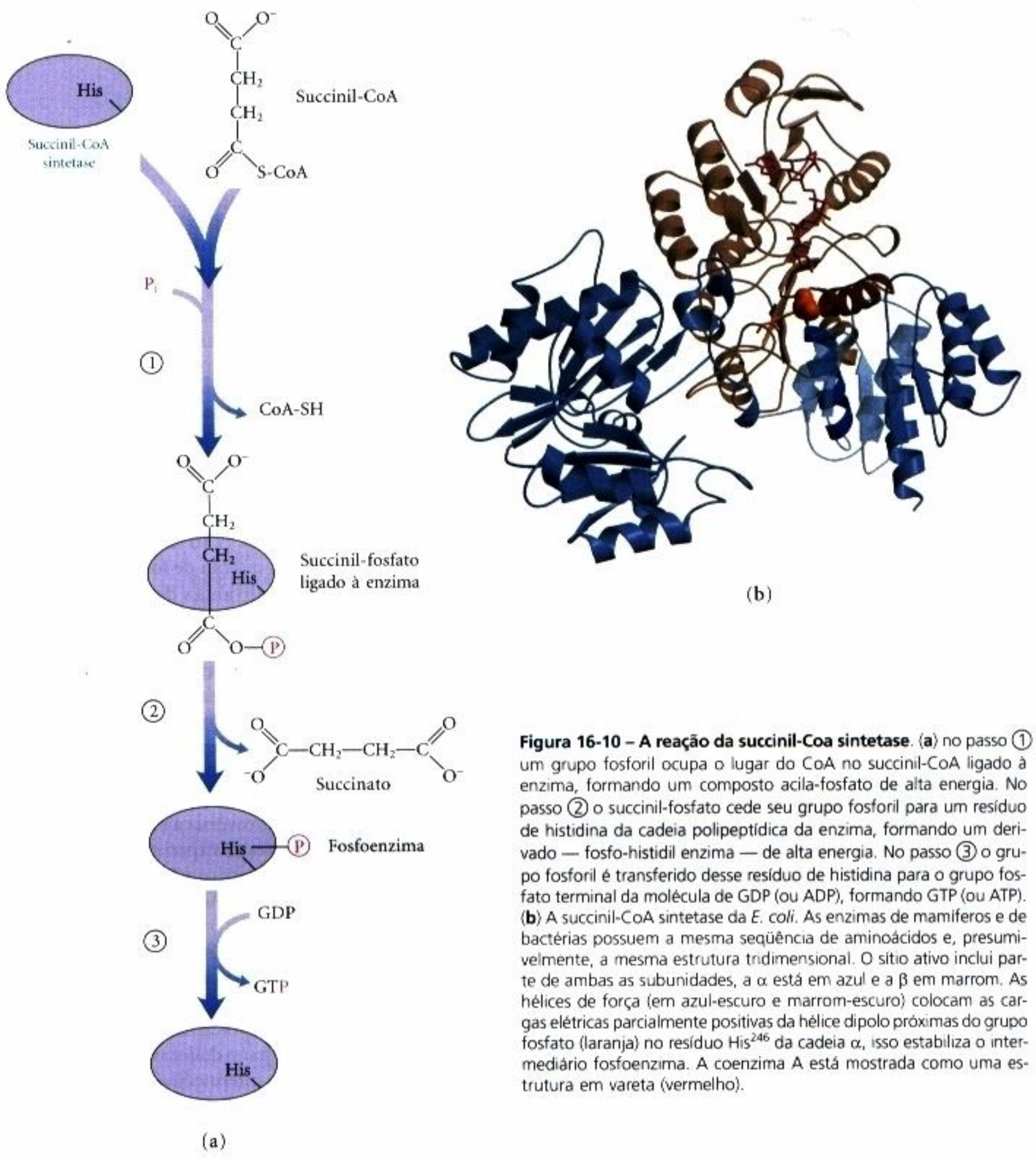

Succinil-CoA sintetase
His
Succinil-CoA
S-CoA
P_i
①
CoA-SH
Succinil-fosfato ligado à enzima
②
Succinato
Fosfoenzima
③
GDP
GTP
(a)
(b)

Figura 16-10 – A reação da succinil-Coa sintetase. (**a**) no passo ① um grupo fosforil ocupa o lugar do CoA no succinil-CoA ligado à enzima, formando um composto acila-fosfato de alta energia. No passo ② o succinil-fosfato cede seu grupo fosforil para um resíduo de histidina da cadeia polipeptídica da enzima, formando um derivado — fosfo-histidil enzima — de alta energia. No passo ③ o grupo fosforil é transferido desse resíduo de histidina para o grupo fosfato terminal da molécula de GDP (ou ADP), formando GTP (ou ATP). (**b**) A succinil-CoA sintetase da *E. coli*. As enzimas de mamíferos e de bactérias possuem a mesma seqüência de aminoácidos e, presumivelmente, a mesma estrutura tridimensional. O sítio ativo inclui parte de ambas as subunidades, a α está em azul e a β em marrom. As hélices de força (em azul-escuro e marrom-escuro) colocam as cargas elétricas parcialmente positivas da hélice dipolo próximas do grupo fosfato (laranja) no resíduo His^{246} da cadeia α, isso estabiliza o intermediário fosfoenzima. A coenzima A está mostrada como uma estrutura em vareta (vermelho).

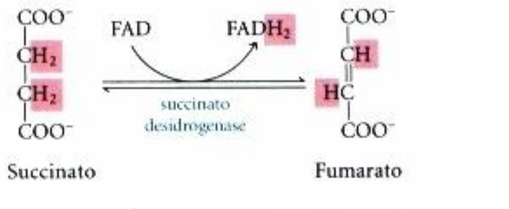
O GTP formado pela succinil-CoA sintetase pode entregar o seu grupo fosfato terminal para o ADP para formar ATP, por meio da ação reversível da **nucleosídeo difosfato quinase** (pág. 510):

$$\text{GTP} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{2+}} \text{GDP} + \text{ATP}$$

$\Delta G'^{\circ} = 0\text{kJ/mol}$

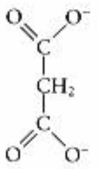
Assim, o resultado final da atividade de qualquer isoenzima da succinil-CoA sintetase é a conservação da energia na forma de ATP. Não há mudança na energia livre na reação da nucleosídeo difosfato quinase; o ATP e o GTP são energeticamente equivalentes.

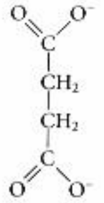
⑥ Oxidação do succinato a fumarato. O succinato formado a partir do succinil-CoA é oxidado a **fumarato** pela flavoproteína **succinato desidrogenase:**


COO⁻
CH₂
CH₂
COO⁻
FAD
FADH₂
succinato desidrogenase
COO⁻
CH
HC
COO⁻
Succinato
Fumarato

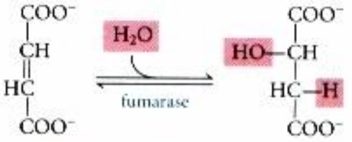
$\Delta G'^{\circ} = 0\text{kJ/mol}$

Nos eucariotos, a succinato desidrogenase é firmemente ligada à membrana mitocondrial interna; nos procariotos, ela é ligada à membrana plasmática. É a única enzima do ciclo do ácido cítrico ligada à membrana. A enzima da mitocôndria do coração de boi contém uma molécula de FAD ligada covalentemente e, ainda, três diferentes agrupamentos ferro-enxofre. Os elétrons retirados do succinato passam por meio do FAD e dos centros ferro-enxofre antes de entrar na cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna (ou na membrana plasmática de bactérias). O fluxo de elétrons do succinato até o O_2, o receptor final de elétrons, por meio desses transportadores, está acoplado à síntese de 1,5 molécula de ATP por par de elétrons (fosforilação ligada à respiração). O malonato, um análogo do succinato, é um potente inibidor competitivo da succinato desidrogenase e, por esse motivo, é um bloqueador do ciclo do ácido cítrico.


Malonato

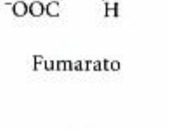

Succinato

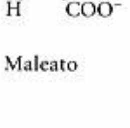
⑦ Hidratação do fumarato para produzir malato. A hidratação reversível do fumarato em **L-malato** é catalisada pela **fumarase (fumarato hidratase)**:

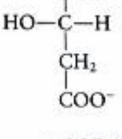


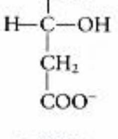
$\Delta G'° = -3{,}8\text{kJ/mol}$

Esta enzima é altamente estereoespecífica; ela catalisa a hidratação da dupla ligação *trans* do fumarato, porém não é capaz de agir no maleato (o isômero *cis* do fumarato). Na direção inversa (de L-malato para fumarato), a fumarase é igualmente estereoespecífica: o D-malato não é um substrato.

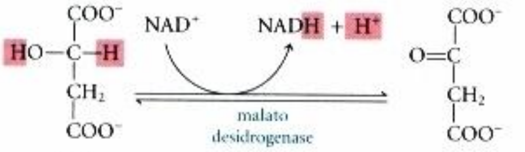

Fumarato


Maleato


L-Malato


D-Malato

⑧ A oxidação do malato a oxaloacetato. Na última reação do ciclo do ácido cítrico, a **L-malato desidrogenase**, ligada ao NAD, catalisa a oxidação do L-malato em oxaloacetato:



$\Delta G'° = 29{,}7\text{kJ/mol}$

O equilíbrio desta reação está muito deslocado para a esquerda sob as condições termodinâmicas padrão. Entretanto, nas células intactas, o oxaloacetato é continuamente removido pela reação da citrato sintase que é altamente exergônica (passo ①). Isso conserva a concentração do oxaloacetato na célula em valores extremamente pequenos ($<10^{-6}$M), deslocando a reação da malato desidrogenase na direção de formação de oxaloacetato.

Embora as reações individuais do ciclo do ácido cítrico tenham sido, inicialmente, estudadas *in vitro*, tendo como material de trabalho extratos de tecido muscular macerado, tanto a via como sua regulação também foram extensivamente estudas *in vivo*. Pelo emprego de precursores marcados radiativamente, como por exemplo [^{14}C]piruvato e [^{14}C]acetato, podemos acompanhar o destino individual de cada átomo de carbono por meio do ciclo do ácido cítrico. Alguns dos primeiros experimentos com isótopos produziram um resultado inesperado que provocou uma considerável controvérsia a respeito da própria via e de seu mecanismo. De fato, esses experimentos, a princípio, pareciam mostrar que o ácido cítrico não era o primeiro ácido tricarboxílico a ser formado. O Adendo 16-2 dá alguns detalhes desse episódio na história das pesquisas sobre o ciclo de Krebs. O fluxo metabólico pode, atualmente, ser monitorado em tecidos vivos por meio de precursores marcados com ^{13}C e espectroscopia NMR (ressonância nuclear magnética) em tecidos totais. Como o sinal NMR é característico do composto contendo o ^{13}C, podemos acompanhar o deslocamento dos carbonos marcados em precursores nos intermediários do ciclo e em compostos deles derivados. Essa técnica promete bons resultados para os estudos da regulação do ciclo do ácido cítrico e suas interconexões com outras vias metabólicas como a glicólise.

A energia de oxidação é eficientemente conservada no ciclo

Acabamos de cobrir uma volta completa do ciclo do ácido cítrico (Fig. 16-11). Um grupo acetil, contendo dois átomos de carbono, foi introduzido no ciclo por combinação com o oxaloacetato. Dois átomos de carbono emergiram do ciclo como CO_2, nos passos em que foram oxidados o isocitrato e o α-cetoglutarato. A energia liberada por essas oxidações foi conservada na redução de três NAD^+ e um FAD e na síntese de uma molécula de ATP ou de GTP. No final do ciclo foi regenerada uma molécula de oxaloacetato. Note que os dois átomos de carbono que aparecem como CO_2 não são os mesmos dois carbonos que entraram no ciclo na forma de grupo acetil; são necessárias voltas adicionais ao longo do ciclo, antes que os átomos de carbono que entraram como grupo acetil finalmente apareçam como CO_2 (Fig. 16-7).

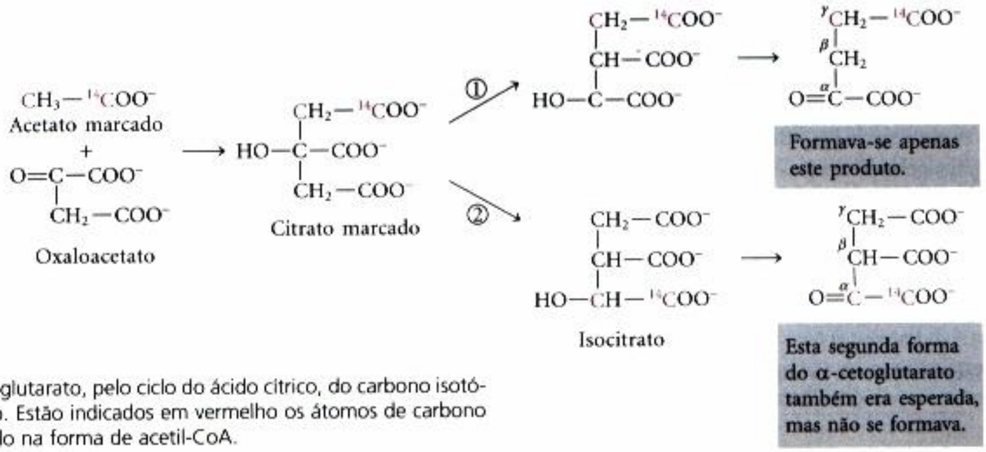
Adendo 16-2 Citrato: uma molécula simétrica que reage assimetricamente

Quando compostos contendo o isótopo pesado do carbono ^{13}C e os isótopos radioativos do mesmo ^{11}C e ^{14}C tornaram-se disponíveis para os bioquímicos, perto de cinqüenta anos atrás, rapidamente foram empregados para traçar a via dos átomos de carbono por meio do ciclo do ácido cítrico. Em um desses experimentos, que iniciou a controvérsia sobre o papel do ácido cítrico, o acetato marcado no grupo carboxila (designado [1-^{14}C]acetato) foi incubado aerobicamente com uma preparação de tecido animal. Nos tecidos animais, o acetato é enzimaticamente convertido em acetil-CoA e, assim, foi possível acompanhar o caminho do átomo de carbono marcado da carboxila do grupo acetil por meio das reações cíclicas. Depois da incubação, o α-cetoglutarato foi isolado da preparação de tecido e degradado por reações químicas conhecidas, de forma a ser possível estabelecer as posições do átomo de carbono isotópico derivado do acetato marcado na carboxila.

Esperava-se que a condensação do oxaloacetato não-marcado com o acetato marcado na carboxila produzisse citrato marcado em um dos dois grupos carboxilas primários. Como o citrato é uma molécula simétrica, sem nenhum carbono assimétrico, os seus dois grupos carboxiterminais são quimicamente indistinguíveis. Portanto, esperava-se que metade das moléculas de citrato marcadas liberasse α-cetoglutarato marcado no grupo α-carboxila e que a outra metade liberasse o α-cetoglutarato marcado no grupo γ-carboxila; isto é, o α-cetoglutarato isolado deveria ser uma mistura de moléculas marcadas em ambos os grupos carboxilas (Fig. 1).

Contrariamente a essa expectativa, o α-cetoglutarato marcado isolado da suspensão de tecido continha apenas o isótopo marcado no grupo γ-carboxila (Fig. 1, via ①). Os pesquisadores concluíram que o próprio citrato, ou qualquer outra molécula simétrica, dificilmente poderia ser uma das substâncias intermediárias no caminho entre o acetato e o α-cetoglutarato. Assim, um ácido tricarboxílico assimétrico, presumivelmente *cis*-aconitato ou isocitrato, deveria ser o primeiro produto da condensação entre acetato e oxaloacetato.

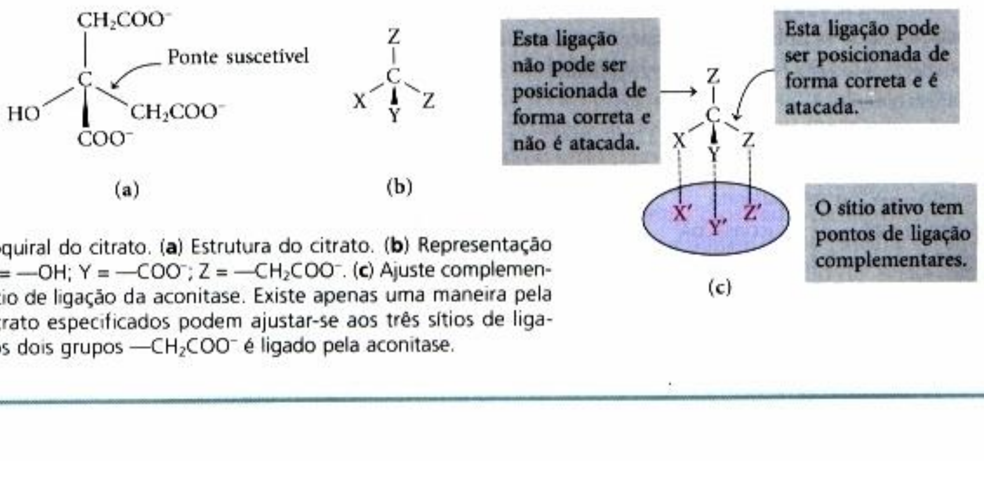
Em 1948, entretanto, Alexander Ogston mostrou que, embora o citrato não tenha centro quiral (veja Fig. 3-9), ele tem a *potencialidade* de reagir assimetricamente, desde que a enzima que age sobre ele tenha um sítio ativo assimétrico. Ele sugeriu que o sítio ativo da aconitase, a enzima que age sobre o citrato recém-formado, pode ter três pontos aos quais a molécula de citrato deve ligar-se e que a molécula do citrato precisa sofrer uma ligação específica por meio desses três pontos de ligação. Como pode ser visto na Figura 2, a ligação do citrato aos três pontos pode acontecer de uma única forma apenas e isso explicaria a formação de um único tipo de α-cetoglutarato marcado. Moléculas orgânicas como o citrato, que não possuem centro quiral mas são potencialmente capazes de reagir assimetricamente com um sítio ativo assimétrico, são agora chamadas de moléculas **proquirais**.



Formava-se apenas este produto.

Esta segunda forma do α-cetoglutarato também era esperada, mas não se formava.

Figura 1 – Incorporação no α-cetoglutarato, pelo ciclo do ácido cítrico, do carbono isotópico (^{14}C) do grupo acetil marcado. Estão indicados em vermelho os átomos de carbono do grupo acetil que entram no ciclo na forma de acetil-CoA.



Esta ligação não pode ser posicionada de forma correta e não é atacada.

Esta ligação pode ser posicionada de forma correta e é atacada.

O sítio ativo tem pontos de ligação complementares.

Figura 2 – A natureza proquiral do citrato. (**a**) Estrutura do citrato. (**b**) Representação esquemática do citrato: X = —OH; Y = —COO^-; Z = —CH_2COO^-. (**c**) Ajuste complementar correto do citrato no sítio de ligação da aconitase. Existe apenas uma maneira pela qual os três grupos de citrato especificados podem ajustar-se aos três sítios de ligação. Assim, apenas um dos dois grupos —CH_2COO^- é ligado pela aconitase.

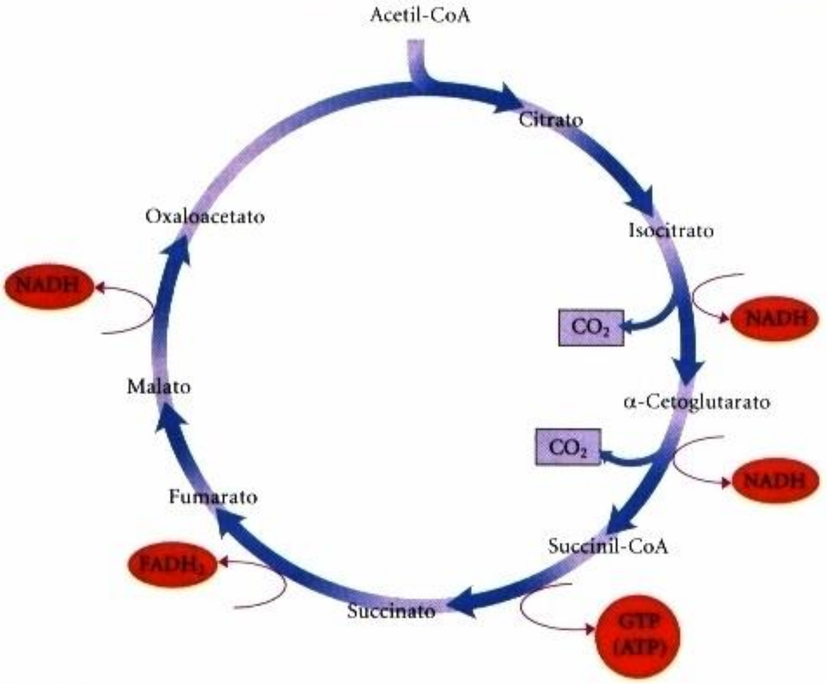


Figura 16-11 – Produtos de uma volta do ciclo do ácido cítrico. Cada volta do ciclo do ácido cítrico produz três NADH e um $FADH_2$, bem como um GTP (ou um ATP). Dois CO_2 são produzidos nas reações de descarboxilação oxidativa. Nesta e em várias figuras a seguir mostramos todas as reações do ciclo ocorrendo em apenas um único sentido, mas lembre-se de que a maioria das reações, na realidade, são reversíveis, como mostrado na Figura 16-7.

Embora o ciclo do ácido cítrico gere diretamente apenas uma molécula de ATP por volta (na conversão de succinil-CoA em succinato), os quatro passos de oxidação do ciclo fornecem um grande fluxo de elétrons para a cadeia respiratória, por meio de NADH e $FADH_2$, e esta leva à formação de um grande número de moléculas de ATP durante a fosforilação oxidativa.

No Capítulo 15 vimos que o rendimento de energia da produção de duas moléculas de piruvato, a partir de uma molécula de glicose, durante a glicólise é representado por duas moléculas de ATP e duas de NADH. Na fosforilação oxidativa (Capítulo 19), a passagem de dois elétrons do NADH para o oxigênio potencia a formação de mais ou menos 2,5 moléculas de ATP, e a passagem de dois elétrons do $FADH_2$ para o oxigênio potencia a formação de 1,5 molécula de ATP. Essa estequiometria nos permite calcular o rendimento em ATP da oxidação completa da glicose. Quando ambos os piruvatos são oxidados até 6 CO_2 por meio da ação do complexo da piruvato desidrogenase e do ciclo do ácido cítrico e os elétrons correspondentes são transferidos para o O_2, 32 moléculas de ATP são obtidas pela glicose (Tabela 16-1). Em números redondos, isso representa a conservação de 32 × 30,5kJ/mol = 976kJ/mol, ou 34% do máximo teórico de 2.840kJ/mol disponíveis pela oxidação completa da glicose. Estes cálculos empregam a energia livre padrão; quando corrigidas para a energia livre verdadeira necessária para sintetizar o ATP no interior celular (Adendo 14-2), a eficiência calculada do processo chega perto dos 65%.

Por que a oxidação do acetato é tão complicada?

O processo cíclico de oito passos enzimáticos para a oxidação até CO_2 do grupo acetil simples com apenas dois átomos de carbono pode parecer desnecessariamente complicado e em desacordo com o princípio biológico da economia máxima. Entre-

Tabela 16-1 – A estequiometria da redução das coenzimas e da formação de ATP na oxidação aeróbica de uma molécula de glicose por meio da via glicolítica seguida da reação da piruvato desidrogenase, do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa

Reação	Número de ATP ou de coenzimas reduzidas formadas diretamente	Número de moléculas de ATP formadas ao final*
Glicose ⟶ glicose-6-fosfato	−1 ATP	−1
Frutose-6-fosfato ⟶ frutose-1,6-bifosfato	−1 ATP	−1
2 Gliceraldeído-3-fosfato ⟶ 2 1,3-bifosfoglicerato	2 NADH	3-5
2 1,3-Bifosfoglicerato ⟶ 2 3-fosfoglicerato	2 ATP	2
2 Fosfoenolpiruvato ⟶ 2 piruvato	2 ATP	2
2 Piruvato ⟶ 2 acetil-CoA	2 NADH	5
2 Isocitrato ⟶ 2 α-cetoglutarato	2 NADH	5
2 α-Cetoglutarato ⟶ 2 succinil-CoA	2 NADH	5
2 Succinil-CoA ⟶ 2 succinato	2 ATP (ou 2 GTP)	2
2 Succinato ⟶ 2 fumarato	2 $FADH_2$	3
2 Malato ⟶ 2 oxaloacetato	2 NADH	5
Total		30-32

*Este número é calculado como 2,5 ATP por NADH e 1,5 ATP por $FADH_2$. Um valor negativo indica consumo.

tanto, a função do ciclo do ácido cítrico não está confinada à oxidação do acetato. Essa via é, na realidade, o centro do metabolismo intermediário. Produtos finais com quatro e cinco átomos de carbono de muitos processos metabólicos são lançados no ciclo para serem utilizados como combustíveis. O oxaloacetato e o α-cetoglutarato, por exemplo, são produzidos a partir de aspartato e glutamato, respectivamente, quando ocorre a degradação de proteínas. Em algumas circunstâncias metabólicas, os intermediários são retirados do ciclo para ser empregados como precursores em uma grande variedade de vias biossintéticas.

O ciclo do ácido cítrico, como todas as demais vias metabólicas, é um produto da evolução, e muito dessa evolução ocorreu antes do advento dos organismos aeróbios. Ela não representa, obrigatoriamente, a via *mais curta* entre o acetato e o CO_2, mas é a via que, ao longo do tempo, conferiu a maior vantagem seletiva. Os anaeróbicos primitivos muito provavelmente empregaram algumas das reações do ciclo do ácido cítrico em processos biossintéticos lineares. De fato, alguns microrganismos anaeróbicos modernos usam um ciclo do ácido cítrico incompleto como fonte, não de energia, mas de precursores de biossínteses. (Fig. 16-12). Esses organismos empregam as três primeiras reações do ciclo para fazer α-cetoglutarato, mas, como não possuem a α-cetoglutarato desidrogenase, não podem conduzir o conjunto completo de reações do ciclo do ácido cítrico. Eles têm as quatro enzimas que catalisam a conversão reversível de oxaloacetato em succinil-CoA e podem produzir malato, fumarato, succinato e succinil-CoA a partir de oxaloacetato em um sentido inverso daquele "normal" (oxidativo) do ciclo. Isso é uma fermentação, com o NADH produzido pela oxidação do isocitrato reciclado pela redução do oxaloacetato em succinato.

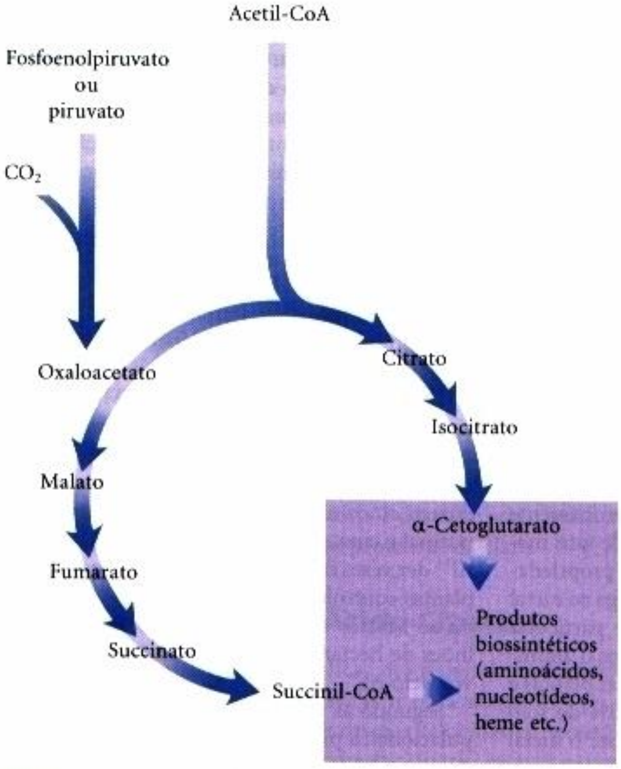


Figura 16-12 – Precursores biossintéticos produzidos por um ciclo do ácido cítrico incompleto presente em bactérias anaeróbias. Estes anaeróbios não têm α-cetoglutarato desidrogenase e, por isso, não podem realizar o ciclo do ácido cítrico completo. O α-cetoglutarato e o succinil-CoA servem como precursores em algumas vias biossintéticas. Veja a Figura 16-11 para a direção "normal" dessas reações no ciclo do ácido cítrico.

Com a evolução das cianobactérias que produziram O_2 a partir da água, a atmosfera da Terra tornou-se oxidante e os organismos ficaram sob pressão evolutiva para desenvolver o metabolismo aeróbico, o qual, como acabamos de observar, é muito mais eficiente que a fermentação anaeróbica.

Os componentes do ciclo do ácido cítrico são intermediários biossintéticos importantes

Nos organismos aeróbicos, o ciclo do ácido cítrico é uma **via anfibólica**, isto é, ela serve tanto a processos catabólicos quanto anabólicos. Ela não funciona apenas no catabolismo oxidativo de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, mas, como nos antecessores anaeróbicos, também fornece precursores para muitas vias biossintéticas (Fig. 16-13). O α-cetoglutarato e oxaloacetato podem servir como precursores dos aminoácidos glutamato e aspartato por simples transaminação (Capítulo 22). Por meio do aspartato e do glutamato os carbonos do oxaloacetato e do α-cetoglutarato são então empregados para construir as moléculas de outros aminoácidos como, também, moléculas de nucleotídeos de purinas e pirimidinas. O oxaloacetato pode ser convertido em glicose por meio da neoglicogênese (veja Fig. 20-2). O succinil-CoA é um componente central na biossíntese do anel de porfirina do grupo heme que serve de transportador do oxigênio na hemoglobina e na mioglobina e como transportador de elétrons nos citocromos. O citrato é sintetizado e liberado por certos microrganismos que, por isso, são aproveitados comercialmente (Adendo 16-3).

As reações anapleróticas repõem os intermediários do ciclo do ácido cítrico

À medida que os intermediários do ciclo do ácido cítrico são removidos para servir de precursores biossintéticos, eles são repostos por meio das **reações anapleróticas** (Fig. 16-13 e Tabela 16-2). Em condições normais, as reações pelas quais os intermediários do ciclo são retirados e aquelas por meio das quais eles são fornecidos estão em equilíbrio dinâmico, de tal forma que as concentrações nos intermediários do ciclo do ácido cítrico permanecem quase constantes.

A Tabela 16-2 mostra as reações anapleróticas mais comuns, todas elas, em vários organismos e tecidos animais, transformam ou piruvato ou fosfoenolpiruvato em oxaloacetato ou malato. A reação anaplerótica mais importante nos tecidos hepático e renal de mamíferos é a carboxilação reversível do piruvato por CO_2, para formar oxaloacetato, catalisada pela **piruvato carboxilase.** Quando o ciclo do ácido cítrico está deficiente em oxaloacetato ou em qualquer outro dos seus intermediários, o piruvato é descarboxilado para produzir mais oxaloacetato. Essa adição enzimática de um grupo carboxila à molécula do piruvato requer energia, que é fornecida pelo ATP. A energia livre necessária para ligar enzimaticamente um grupo carboxila ao piruvato é mais ou menos igual à energia livre fornecida pelo ATP.

A piruvato carboxilase é uma enzima reguladora e virtualmente inativa na ausência de acetil-CoA, o seu modulador alostérico positivo. Sempre que o acetil-CoA, que é o combustível para o ciclo do ácido cítrico, está presente em excesso, estimula a reação da piruvato carboxilase para produzir mais oxaloacetato, capacitando o ciclo para usar maior quantidade de acetil-CoA na reação da citrato sintase.

As reações anapleróticas mostradas na Tabela 16-2 são também reguladas para manter o nível de intermediários alto o suficiente para suportar a atividade do ciclo do ácido cítrico. Por exemplo, a fosfoenolpiruvato carboxilase é ativada pelo intermediário glicolítico frutose-1,6-bifosfato, o nível do qual aumenta quando o ciclo do ácido cítrico opera muito vagarosamente para processar todo o piruvato gerado pela glicólise.

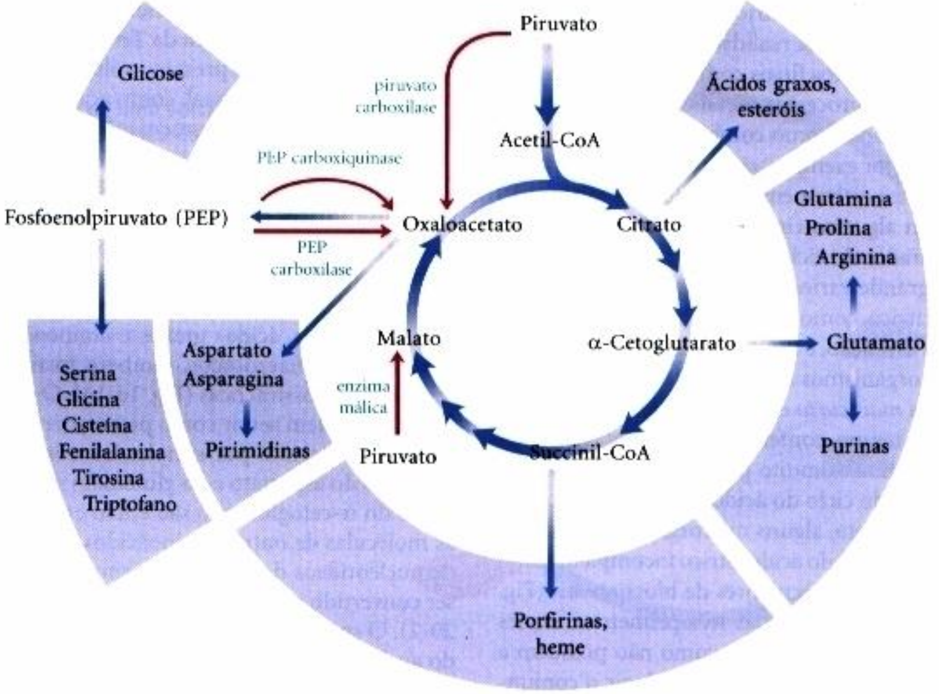


Figura 16-13 – Papel do ciclo do ácido cítrico no anabolismo. Os intermediários do ciclo do ácido cítrico estão mostrados como precursores em muitas vias biossinteticas. Mostradas em vermelho estão quatro reações anapleróticas que recompõem os intermediários do ciclo quando em baixa concentração (veja Tabela 16-2).

Adendo 16-3 Citrato sintase, refrigerantes e o suprimento de alimentos para o mundo

O citrato tem numerosas e importantes aplicações industriais. Um exame rápido dos ingredientes presentes na maioria dos refrigerantes revela o emprego comum do ácido cítrico para conferir um sabor ácido ou frutado. O ácido cítrico é, também, empregado como plastificador e antiespumante na manufatura de algumas resinas, como mordente para dar brilho às cores do tecidos e como antioxidante para preservar o aroma de alimentos. O ácido cítrico é produzido industrialmente pelo cultivo do fungo *Aspergillus niger* na presença de uma fonte barata de carboidratos, em geral melaço de beterraba. As condições de cultivo são tais que as reações do ciclo do ácido cítrico são inibidas, dessa forma ocorre um acúmulo de citrato.

Em uma escala global, o ácido cítrico pode desempenhar um papel espetacular no alívio da fome no mundo. Com suas três carboxilas eletricamente negativas, o citrato é um bom quelante de íons metálicos, e algumas plantas exploram essa propriedade liberando citrato no solo, onde ele se liga ao metal e impede sua absorção pelo vegetal. De particular importância nesse problema encontramos o alumínio iônico (Al^{3+}), que é tóxico para muitas plantas e provoca colheitas menores em 30% a 40% do solo arável do mundo. Apesar de o alumínio ser o metal mais abundante na crosta terrestre, ele ocorre em compostos que são biologicamente inertes, como o hidróxido de alumínio — $Al(OH)_3$. Entretanto, quando o pH do solo é menor que 5, o Al^{3+} torna-se solúvel e pode ser absorvido pelas raízes dos vegetais. O solo ácido e a toxicidade do Al^{3+} são fortemente prevalentes nas regiões tropicais, onde as safras de milho podem ser reduzidas em até 80%. No México, a produção de mamões é limitada pela toxicidade do Al^{3+} a uma área de 20.000 hectares, quando a área teoricamente possível de ser cultivada é de 3 milhões de hectares. Uma solução seria a de elevar o pH do solo com calcário, mas isso é econômica e ambientalmente desaconselhado. Outra alternativa seria a de se obter mamoeiros resistentes ao Al^{3+}. Plantas naturalmente resistentes já existem e fornecem os meios para uma terceira solução alternativa: transferir a resistência para plantas fornecedoras de colheitas por meio da engenharia genética.

Um grupo de pesquisadores no México produziu, por engenharia genética, mamoeiros e plantas do tabaco capazes de sintetizar em níveis elevados uma citrato sintase bacteriana. Esses vegetais produzem cinco a seis vezes mais ácido cítrico que o normal e crescem em presença de concentrações de Al^{3+} dez vezes maiores que o máximo suportado por plantas controles. Esse nível de resistência permitiria ao México cultivar mamoeiros nos quase 3 milhões de hectares atualmente tornados improdutivos pelo Al^{3+}.

Segundo as taxas projetadas de crescimento populacional, a produção de alimentos precisará mais do que triplicar dentro de 50 anos para poder alimentar adequadamente 9,6 bilhões de pessoas. Uma solução a longo prazo pode ser aumentar a produtividade das colheitas nas terras aráveis afetadas pela toxicidade do alumínio, e o ácido cítrico pode ter um papel importante na realização desse objetivo.

Tabela 16-2 – Reações anapleróticas

Reação	Tecido(s)/organismo(s)
Piruvato + HCO_3^- + ATP $\overset{\text{piruvato carboxilase}}{\rightleftharpoons}$ oxaloacetato + ADP + P_i	Fígado, rim
Fosfoenolpiruvato + CO_2 + GDP $\overset{\text{PEP carboxiquinase}}{\rightleftharpoons}$ oxaloacetato + GTP	Coração, músculo esquelético
Fosfoenolpiruvato + HCO_3^- $\overset{\text{PEP carboxilase}}{\longrightarrow}$ oxaloacetato + P_i	Vegetais superiores, levedura, bactérias
Piruvato + HCO_3^- + NAD(P)H $\overset{\text{enzima málica}}{\rightleftharpoons}$ malato + NAD(P)$^+$	Largamente distribuída nos eucariotos e procariotos

A biotina transporta grupos CO_2 na piruvato carboxilase

A reação catalisada pela piruvato carboxilase requer a vitamina **biotina** (Fig. 16-14), que é o grupo prostético da enzima. A biotina desempenha um papel-chave em muitas reações de carboxilação. Essa vitamina é um transportador especializado de grupos com um átomo de carbono na sua forma mais oxidada: CO_2 (a transferência de grupos de um carbono em formas mais reduzidas é mediada por outros co-fatores, principalmente o tetraidrofolato e a *S*-adenosilmetionina, como descrito no Capítulo 18). Os grupos carboxila são ativados em uma reação que quebra o ATP e une o CO_2 à biotina ligada na enzima. Esse CO_2 "ativado" é, então, passado para um receptor (no caso o piruvato) em uma reação de carboxilação.

A piruvato carboxilase é composta de quatro subunidades idênticas, cada uma delas contendo uma molécula de biotina ligada covalentemente, por meio de uma ligação amida ao grupo ε-amino de um resíduo específico de lisina, localizado no sítio ativo da enzima (Fig. 16-14). A carboxilação do piruvato ocorre em dois passos; primeiro um grupo carboxila derivado do HO_3^- é ligado à biotina, então o grupo carboxila é transferido ao piruvato para formar oxaloacetato. Esses dois passos ocorrem em sítios ativos separados; o braço longo e flexível de biotina permite a transferência de grupos carboxila ativados do primeiro sítio ativo até o segundo, de forma muito semelhante àquela do braço longo de lipoilisil de E_2 no complexo da piruvato desidrogenase.

A biotina é uma vitamina, logo é necessário que esteja presente na alimentação humana; ela é abundante em muitos alimentos e sintetizada pelas bactérias do intestino. Doenças carenciais dessa vitamina são raras e, em geral, são observadas apenas quando grandes quantidades de ovos crus são consumidas por uma pessoa. A clara do ovo contém uma grande quantidade de uma proteína chamada **avidina** (M_r 70.000), essa proteína se liga fortemente à biotina e impede a sua absorção no intestino. A avidina, presente na clara do ovo, pode ser um mecanismo de defesa, atuando como inibidor do crescimento de bactérias. Quando os ovos são cozidos, a avidina é desnaturada e inativada, juntamente com todas as outras proteínas da clara.

Regulação do Ciclo do Ácido Cítrico

As enzimas-chave das vias metabólicas são reguladas por efetores alostéricos e por modificação covalente para assegurar a produção de intermediários e de produtos nas velocidades necessárias para manter a célula em estado estacionário estável e para evitar a superprodução desperdiçadora de intermediários (veja págs. 427-429). O fluxo de átomos de carbono do piruvato para o ciclo do ácido cítrico e através dele é estreitamente regulado em dois níveis: a conversão de piruvato em acetil-CoA, o material inicial do ciclo (a reação do complexo da piruvato desidrogenase), e a entrada de acetil-CoA no ciclo (a reação da citrato

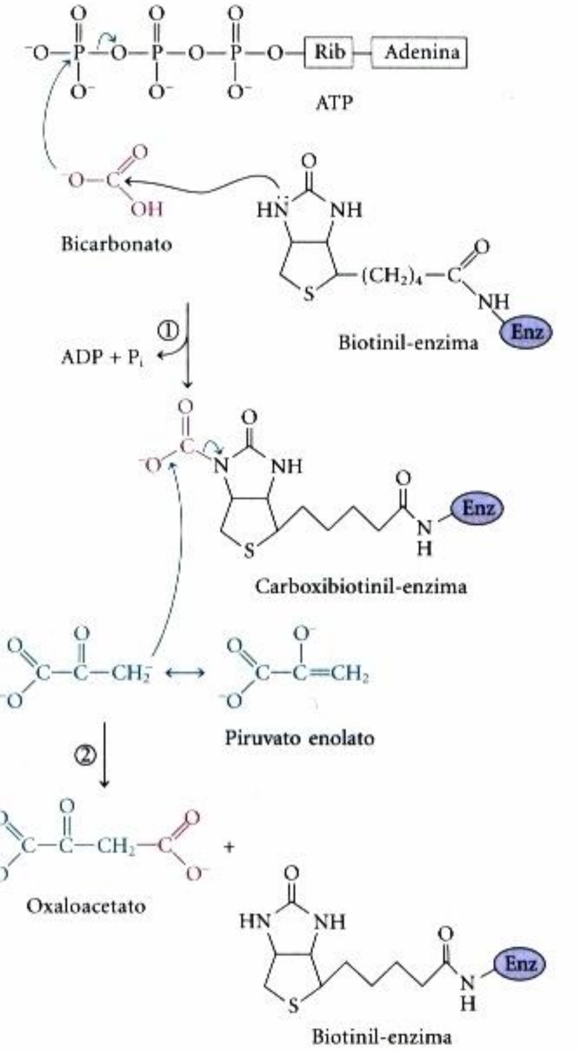


Figura 16-14 – O papel da biotina na reação catalisada pela piruvato carboxilase. A biotina está ligada à enzima por meio de uma ligação amida com o grupo ε-amino de um resíduo de lisina, formando a biotinil-enzima. A enzima catalisa um processo em dois passos. No passo ①, um átomo de nitrogênio da biotina faz um ataque nucleofílico ao íon bicarbonato (vermelho), a forma predominante do CO_2 em pH 7. Simultaneamente, um átomo de oxigênio do bicarbonato ataca o fosfato terminal do ATP, deslocando o P_i e formando um carboxifosfato transiente (não mostrado). Esse passo adiciona a energia da hidrólise do ATP à variação global de energia livre para a reação. Os átomos restantes do bicarbonato são, agora, reunidos à biotina como "CO_2 ativado", carboxibiotinil-enzima. O grupo carboxibiotinil está na ponta de um braço longo e flexível (a cadeia lateral do resíduo de lisina e os grupos metileno da biotina) que oscila entre o sítio de ativação do CO_2 e o sítio de carboxilação do piruvato. A ligação covalente assegura que o intermediário ativado não deixará a superfície da enzima. No passo ②, o piruvato em sua forma enol ionizada (enolato) (em azul) faz um ataque nucleofílico ao CO_2 ativado, deslocando a biotinil-enzima e formando o oxaloacetato. Mecanismos similares ocorrem em outras reações de carboxilação dependentes de biotina, como a propionil-CoA carboxilase (veja Fig. 17-11) e a acetil-CoA carboxilase (veja Fig. 21-1).

sintase). Como piruvato não é a única fonte de acetil-CoA (a maioria das células pode obter acetil-CoA pela oxidação dos ácidos graxos e de certos aminoácidos), a possibilidade de obtenção de intermediários dessas outras vias é muito importante na regulação da oxidação do piruvato e do ciclo do ácido cítrico. O ciclo também é regulado na altura da reação da isocitrato desidrogenase e na reação da α-cetoglutarato desidrogenase.

A produção de acetil-CoA pelo complexo da piruvato desidrogenase é regulada por mecanismos alostéricos e covalentes

O complexo da piruvato desidrogenase de vertebrados é fortemente inibido por ATP e por acetil-CoA e NADH, os produtos da reação catalisados pelo complexo (Fig. 16-15). Essa inibição alostérica da oxidação do piruvato é muito aumentada quando estão presentes ácidos graxos de cadeia longa. Quando muito pouco acetato flui para o ciclo do ácido cítrico, acumulam-se AMP, CoA e NAD^+, todos eles ativam alostericamente o complexo da piruvato desidrogenase. Assim, a atividade dessa enzima é desligada quando as substâncias combustíveis estão disponíveis de maneira ampla na forma de ácidos graxos e acetil-CoA e quando as relações [ATP]/[ADP] e [NADH]/$[NAD^+]$ estão altas; entretanto, quando a demanda por energia está alta e é necessário um fluxo maior de acetil-CoA para o ciclo, a atividade do complexo enzimático é ligada.

Nos vertebrados, esses mecanismos de regulação alostérica do complexo da piruvato desidrogenase são complementados por um segundo nível de regulação, a modificação covalente de proteínas. O complexo enzimático é inibido pela fosforilação reversível de um resíduo específico de serina em uma das duas subunidades de E_1. Como foi observado anteriormente, em adição às enzimas E_1, E_2 e E_3, o complexo da piruvato desidrogenase contém duas proteínas reguladoras, cujo único propósito é regular a atividade do mesmo complexo. Uma proteína quinase específica fosforila e, assim, inativa E_1, uma fosfoproteína fosfatase específica remove o grupo fosfato por hidrólise e, dessa forma, ativa E_1. A quinase é ativada alostericamente por ATP, quando os níveis de ATP estão altos (refletindo um suprimento de energia suficiente), o complexo da piruvato desidrogenase é inativado por fosforilação de E_1. Quando os níveis de [ATP] declinam, a atividade da quinase decresce e a ação da fosfatase remove os fosfatos de E_1, ativando o complexo.

O complexo da piruvato desidrogenase de vegetais, encontrado na matriz mitocondrial e dentro de plastídios, é fortemente inibido por NADH, que pode ser o seu regulador primário. Existem também evidências de que a inativação da enzima mitocondrial vegetal seja controlada por fosforilação reversível. O complexo da piruvato desidrogenase da *E. coli* está sob regulação alostérica similar àquela da enzima de vertebrados, mas a regulação por fosforilação aparentemente não ocorre na enzima bacteriana.

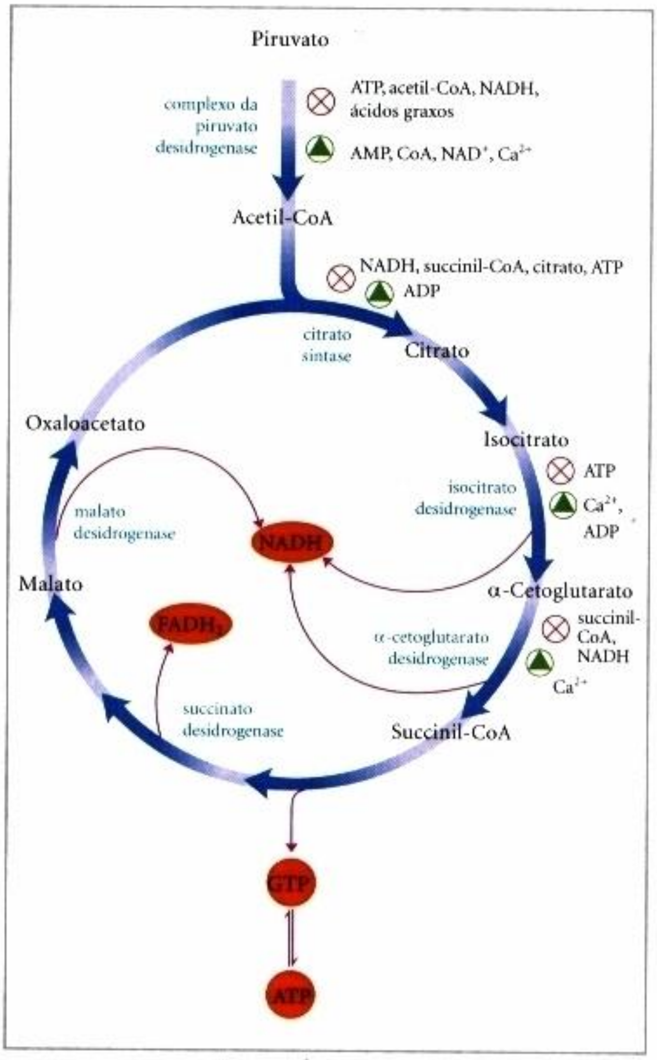


Figura 16-15 – Regulação do fluxo metabólico que se inicia com o piruvato e atravessa o ciclo do ácido cítrico. O complexo da piruvato desidrogenase é inibido alostericamente por valores altos das relações [ATP]/[ADP], [NADH]/$[NAD^+]$ e [acetil-CoA]/[CoA], que indicam um estado suficiente de liberação de energia metabólica. A diminuição desses valores resulta em ativação alostérica da oxidação do piruvato. A velocidade do fluxo por meio do ciclo do ácido cítrico pode ser limitada pela disponibilidade dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato, ou pela depleção do NAD^+ por meio de sua redução a NADH, o que diminui a velocidade dos três passos oxidativos nos quais o NAD^+ é co-fator. A inibição retroativa pelo succinil-CoA, citrato e ATP também diminui a velocidade do ciclo por desacelerar as suas primeiras reações. No tecido muscular, Ca^{2+} sinaliza o início da contração e estimula o metabolismo liberador de energia, de maneira a repor o ATP consumido pela atividade muscular.

O ciclo do ácido cítrico é regulado na altura de seus três passos exergônicos

O fluxo de metabólitos por meio do ciclo do ácido cítrico está sob regulação estrita. Três fatores governam a velocidade do fluxo por meio do ciclo: disponibilidade de substratos, inibição por acúmulo de produtos e inibição alostérica retroativa das primeiras enzimas da via.

No ciclo, três passos são fortemente exergônicos, aqueles catalisados pela citrato sintase, isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase (Fig. 16-15). Sob determinadas circunstâncias, cada um deles pode tornar-se o passo limitante da velocidade global. A disponibilidade de substratos para a citrato sintase (acetil-CoA e oxaloacetato) varia com as circunstâncias metabólicas e algumas vezes limita a velocidade de formação do citrato. O NADH, um produto da oxidação do citrato e do α-cetoglutarato, acumula-se sob determinadas condições, e quando a relação [NADH]/$[NAD^+]$ torna-se elevada, as duas reações de desidrogenação são severamente inibidas pela lei da ação das massas. De forma similar, a reação da malato desidrogenase está essencialmente em equilíbrio na célula (isto é, ela é limitada pelo substrato; veja Figura 15-16), e quando [NADH]/$[NAD^+]$ é elevada, a concentração de oxaloacetato é baixa, desacelerando o primeiro passo no ciclo. A acumulação dos produtos inibe todos os três passos limitantes da velocidade do ciclo: a succinil-CoA inibe a α-cetoglutarato desidrogenase (e também a citrato sintase); o citrato bloqueia a citrato sintase; enquanto o produto final, ATP, inibe ambas: a citrato sintase e a isocitrato desidrogenase. A inibição da citrato sintase pelo ATP é aliviada pelo ADP, um ativador alostérico dessa enzima. Os íons cálcio, que nos músculos dos vertebrados são o sinal para contração e o concomitante aumento na demanda por ATP, ativam ambas as enzimas, isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase, assim como o complexo da piruvato desidrogenase. Em resumo, as concentrações de substratos e intermediários do ciclo do ácido cítrico regulam o fluxo por meio dessa via em uma velocidade que fornece concentrações ótimas de ATP e NADH.

Sob condições normais as velocidades da glicólise e do ciclo do ácido cítrico são de tal forma integradas que é metabolizada apenas a quantidade exata de glicose que fornece o ácido pirúvico suficiente para suprir o ciclo do ácido cítrico com seu combustível, os grupos acetil do acetil-CoA. Piruvato, lactato e acetil-CoA são normalmente mantidos nas concentrações do estado estacionário. A velocidade da glicólise é ajustada à velocidade do ciclo do ácido cítrico, não só pela concentração de citrato, mas também por meio de sua inibição por altos níveis de ATP e NADH, que são componentes comuns dos dois estágios da oxidação da glicose — glicolítico e respiratório. O citrato, o produto do primeiro passo do ciclo do ácido cítrico, funciona como um importante inibidor alostérico da fosforilação da frutose-6-fosfato por fosfofrutoquinase-1 na via glicolítica (pág. 430).

O Ciclo do Glioxalato

Os vertebrados não conseguem converter ácidos graxos, ou o acetato deles derivado, em carboidratos. A conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato (pág. 417) e do piruvato em acetil-CoA (Fig. 16-2) são tão exergônicas que são essencialmente irreversíveis. Se uma célula não tem a capacidade de converter acetato em fosfoenolpiruvato, o acetato não pode servir de material de partida para a via gliconeogênica que leva do fosfoenolpiruvato até a glicose (veja Fig. 20-2). Sem essa capacidade, um organismo ou uma célula é incapaz de converter em carboidratos os combustíveis que são degradados até acetato (ácidos graxos e certos aminoácidos).

Como vimos em nossa discussão sobre as reações anapleróticas (Tabela 16-2), o fosfoenolpiruvato pode ser sintetizado a partir do oxaloacetato na reação reversível catalisada pela PEP carboxiquinase:

$$\text{Oxaloacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + CO_2 + \text{GDP}$$

Como os átomos de carbono das moléculas de acetato que entram no ciclo do ácido cítrico aparecem no oxaloacetato oito passos depois, pode parecer que a operação do ciclo do ácido cítrico é capaz de gerar oxaloacetato a partir do acetato e, assim, gerar fosfoenolpiruvato para a gliconeogênese. Entretanto, examinando a estequiometria do ciclo, revela-se que não há conversão *líquida* de acetato em oxaloacetato; nos vertebrados, para cada dois carbonos que entram no ciclo como acetil-CoA, dois átomos de carbono saem dele, obrigatoriamente, como CO_2. Em muitos organismos não vertebrados, o **ciclo do glioxalato** serve como um mecanismo para converter acetato em carboidrato.

O ciclo do glioxalato produz compostos com quatro átomos de carbono derivados do acetato

Nos vegetais, em certos invertebrados e em alguns microrganismos como a *E. coli* e a levedura, o acetato pode servir tanto como um combustível rico em energia como uma fonte de fosfoenolpiruvato para a síntese de carboidratos. Nesses organismos, as enzimas do **ciclo do glioxalato catalisam a conversão de acetato** em succinato ou outros intermediários com quatro átomos de carbono do ciclo do ácido cítrico.

$$2\ \text{Acetil-CoA} + NAD^+ + 2H_2O \longrightarrow \text{succinato} + 2\text{CoA} + NADH + H^+$$

No ciclo do glioxalato, exatamente como no ciclo do ácido cítrico, o acetil-CoA condensa com o oxaloacetato para formar citrato. Entretanto, o rompimento do isocitrato não ocorre por meio da ação da isocitrato desidrogenase, mas pela clivagem catalisada pela enzima **isocitrato liase**, para formar **succinato** e **glioxalato**. A seguir, o glioxalato é condensado com uma segunda molécula do acetil-CoA para formar malato, em uma reação catalisada pela **malato sintase**. O malato é subseqüentemente oxidado até oxaloacetato, o qual pode se condensar com outra molécula de acetil-CoA e iniciar outra volta desse ciclo (Fig. 16-16). Em cada volta do ciclo do glioxalato, entram duas moléculas de acetil-CoA e ocorre síntese líquida de uma molécula de succinato, que fica disponível para propósitos biossintéticos. O succinato pode ser convertido por meio do fumarato e do malato em oxaloacetato, o qual pode ser convertido em fosfoenolpiruvato pela reação da PEP carboxiquinase, como já descrito. O fosfoenolpiruvato pode ser utilizado como precursor da glicose na gliconeogênese.

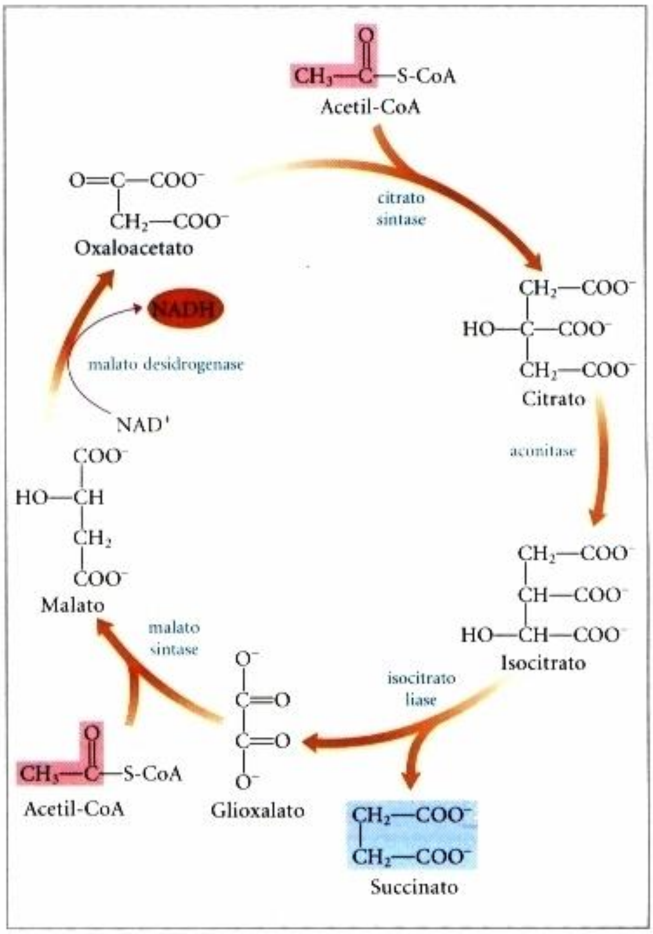


Figura 16-16 – Ciclo do glioxalato. A citrato sintase, a aconitase e a malato desidrogenase são isozimas das enzimas do ciclo do ácido cítrico; a isocitrato liase e a malato sintase são enzimas únicas do ciclo do glioxalato. Note que dois grupos acetil (vermelho) entram no ciclo e quatro átomos de carbono saem dele como succinato (azul). O ciclo do glioxalato foi elucidado por Hans Kornberg e Neil Madsen no laboratório de Hans Krebs.

Nos vegetais, as enzimas do ciclo do glioxalato são seqüestradas em organelas presas às membranas chamadas glioxissomos (Fig. 16-17). Aquelas enzimas comuns aos ciclos do ácido cítrico e do glioxalato existem como duas isoenzimas, uma específica da mitocôndria, outra específica do glioxissomo. Os glioxissomos não estão presentes em todos os tecidos da planta e em todos os momentos. Eles se desenvolvem em sementes ricas em lipídios durante a germinação, antes que o vegetal em desenvolvimento adquira a capacidade de sintetizar glicose por fotossíntese. Em adição às enzimas do ciclo do glioxalato, os glioxissomos também contêm todas as enzimas necessárias para a degradação dos ácidos graxos armazenados nos óleos das sementes oleaginosas (veja Fig. 17-12). O acetil-CoA formado a partir de lipídios é convertido em succinato através do ciclo do glioxalato e o succinato é exportado para as mitocôndrias, nestas as enzimas do ciclo do ácido cítrico o transformam em malato. Uma isoenzima da malato desidrogenase oxida o malato em oxaloacetato, um precursor da gliconeogênese. As sementes em germinação podem, assim, converter em glicose os átomos de carbono armazenados na forma de lipídios.

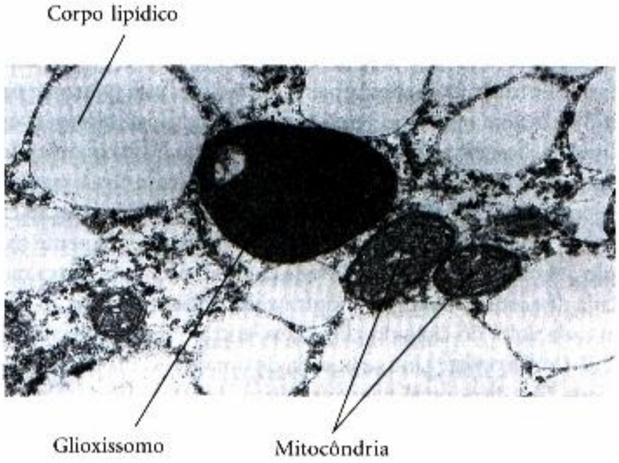

Corpo lipídico
Glioxissomo
Mitocôndria

Figura 16-17 – Microfotografia eletrônica de uma semente de pepino em germinação, mostrando um glioxissomo, mitocôndrias e corpos lipídicos ao redor.

Os animais vertebrados não possuem as enzimas específicas do ciclo do glioxalato (a isocitrato liase e a malato sintase) e por isso não podem realizar a síntese líquida da glicose a partir de lipídios.

O ciclo do ácido cítrico e o ciclo do glioxalato são regulados de forma coordenada

Nas sementes em germinação as transformações enzimáticas dos ácidos di e tricarboxílicos ocorrem em três compartimentos intracelulares: mitocôndrias, glioxissomos e citosol. Entre esses compartimentos há um intercâmbio contínuo de intermediários (Fig. 16-18).

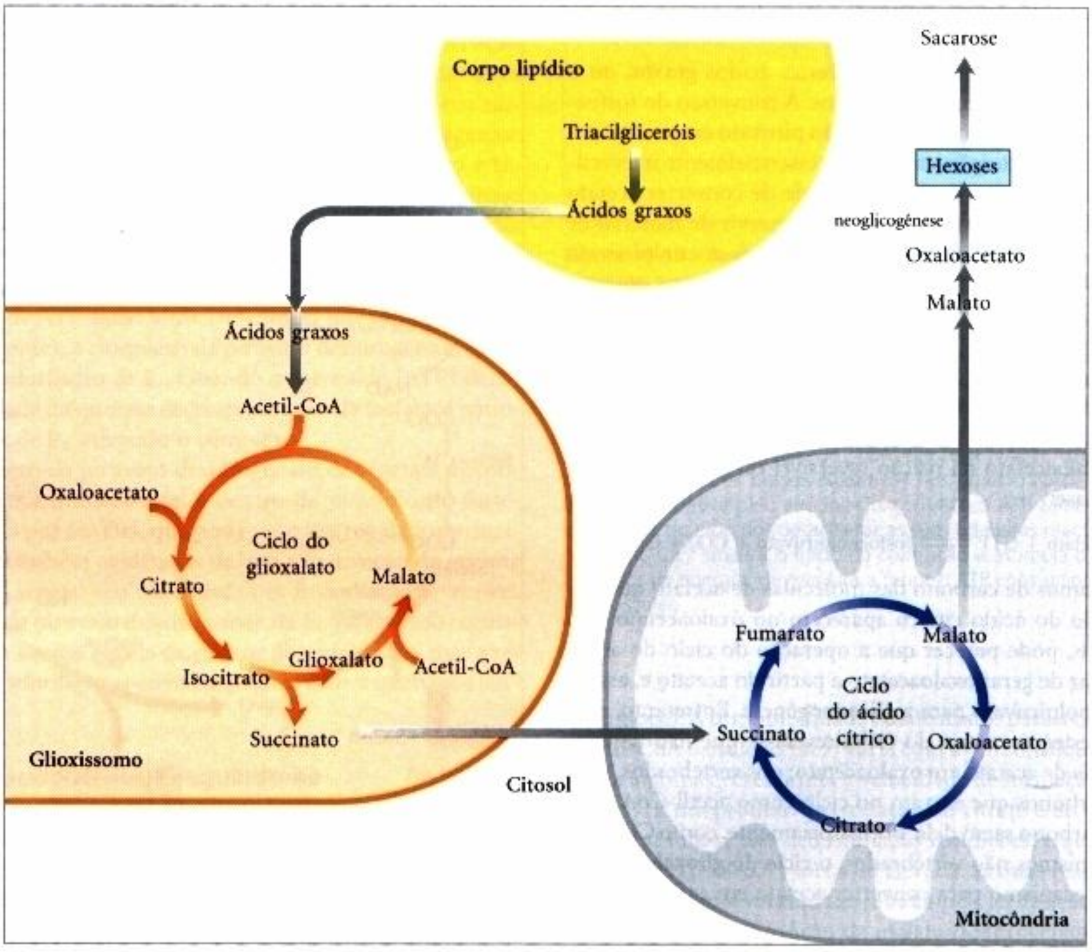

Sacarose
Corpo lipídico
Triacilgliceróis
Ácidos graxos
Hexoses
neoglicogênese
Oxaloacetato
Malato
Ácidos graxos
Acetil-CoA
Oxaloacetato
Ciclo do glioxalato
Malato
Citrato
Glioxalato
Acetil-CoA
Isocitrato
Succinato
Glioxissomo
Citosol
Fumarato
Malato
Ciclo do ácido cítrico
Succinato
Oxaloacetato
Citrato
Mitocôndria

Figura 16-18 – Relações entre os ciclos do glioxalato e do ácido cítrico. As reações do ciclo do glioxalato (nos glioxissomos) ocorrem simultaneamente e misturam-se com aquelas do ciclo do ácido cítrico (nas mitocôndrias), à medida que os intermediários passam entre esses compartimentos por meio do citosol. A conversão do succinato em oxaloacetato é catalisada por enzimas do ciclo do ácido cítrico. A oxidação dos ácidos graxos em acetil-CoA está descrita no Capítulo 17; a síntese de hexoses a partir do oxaloacetato no Capítulo 20.

O esqueleto carbônico do oxaloacetato do ciclo do ácido cítrico (na mitocôndria) é transportado para o glioxissomo na forma de aspartato; o aspartato é transformado em oxaloacetato e se condensa com o acetil-CoA derivado da quebra dos ácidos graxos. O citrato então formado é convertido em isocitrato pela aconitase, e este é rompido em glioxalato e succinato pela isocitrato liase. O succinato retorna à mitocôndria onde é transformado em malato no ciclo do ácido cítrico, esse malato volta ao citosol e é oxidado (pela malato desidrogenase) em oxaloacetato. Então, esse oxaloacetato, via neoglicogênese, é transformado em hexoses e sacarose, e esta é transportada para as raízes em crescimento e para a folhagem. Quatro vias distintas participam dessas conversões: a quebra dos ácidos graxos em acetil-CoA (nos glioxissomos), o ciclo do glioxalato (nos glioxissomos), o ciclo do ácido cítrico (na mitocôndria) e a gliconeogênese (no citosol).

O compartilhamento de intermediários comuns requer que essas vias sejam reguladas de maneira coordenada. Situado no ponto de bifurcação entre os ciclos do ácido cítrico e do glioxalato, o isocitrato é um intermediário crucial (Fig. 16-19). A isocitrato desidrogenase é regulada por modificação covalente: uma proteína quinase específica fosforila e, com isso, inativa essa desidrogenase. A inativação da isocitrato desidrogenase força o redirecionamento do isocitrato para o ciclo do glioxalato, em que ele inicia a rota sintética em direção à glicose. Uma fosfoproteína fosfatase remove o grupo fosfato da isocitrato desidrogenase, reativando a enzima e fornecendo mais isocitrato para o ciclo do ácido cítrico que é liberador de energia. A proteína quinase reguladora e a fosfoproteína fosfatase são atividades enzimáticas separadas, mas ambas residem no mesmo polipeptídeo.

Algumas bactérias, incluindo a *E. coli*, possuem um conjunto completo de enzimas para os ciclos do ácido cítrico e do glioxalato no citosol. A *E. coli* pode, portanto, crescer tendo o acetato como sua única fonte de carbono e de energia. A atividade da fosfatase, que provoca a ativação da isocitrato desidrogenase, é estimulada por intermediários do ciclo do ácido cítrico e da glicólise e por níveis reduzidos dos indicadores de suprimento de energia celular (Fig. 16-19). Os mesmos metabólitos *inibem* a atividade de proteína quinase da enzima bifuncional. Assim, o acúmulo de intermediários das vias centrais liberadoras de energia, ou a falta de energia, resulta na ativação da isocitrato desidrogenase. Quando a concentração desses reguladores cai, sinalizando fluxo suficiente por meio do ciclo do ácido cítrico liberador de energia, a isocitrato desidrogenase é inativada pela proteína quinase.

Os mesmos intermediários dos ciclos do ácido cítrico e da via glicolítica que levam à ativação da isocitrato desidrogenase são inibidores alostéricos da isocitrato liase. Quando o metabolismo liberador de energia ocorre suficientemente rápido para manter as concentrações de intermediários da glicólise e do ciclo do ácido cítrico baixos, a isocitrato desidrogenase é inativada, a inibição da isocitrato liase é liberada e o isocitrato flui na via do glioxalato, em que ele é empregado na biossíntese de carboidratos, aminoácidos e outros componentes celulares.

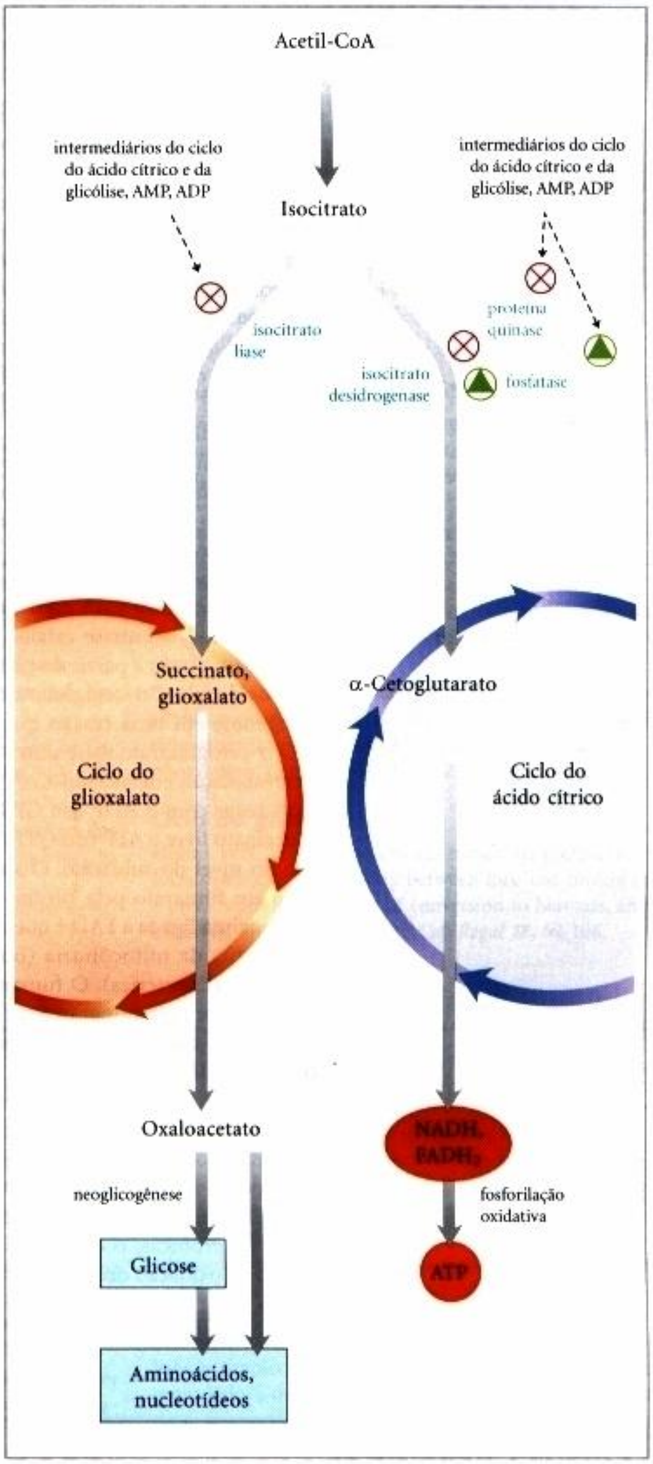


Figura 16-19 – É a regulação da isocitrato desidrogenase que determina a partilha do isocitrato entre os ciclos do ácido cítrico e do glioxalato. Quando a isocitrato desidrogenase é inativada por fosforilação (por meio de uma proteína quinase específica), o isocitrato é direcionado para reações biossintéticas por meio do ciclo do glioxalato. Quando a enzima é ativada por defosforilação (por meio de uma fosfatase específica), o isocitrato entra no ciclo do ácido cítrico e ocorre a produção de ATP.

Resumo

A respiração celular ocorre em três estágios: (1) a formação oxidativa do acetil-CoA a partir de piruvato, ácidos graxos e alguns aminoácidos; (2) a degradação dos resíduos de acetil pelo ciclo do ácido cítrico com a liberação de CO_2 e de coenzimas reduzidas e (3) a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, acoplada à fosforilação do ADP em ATP. O catabolismo oxidativo da glicose libera muito mais energia que as vias fermentativas anaeróbicas.

O piruvato, o produto final da glicólise, sofre desidrogenação e descarboxilação pelo complexo da piruvato desidrogenase — amplo complexo que contém três enzimas atuando seqüencialmente e requer cinco coenzimas — para liberar acetil-CoA e CO_2. O acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico, o qual ocorre na mitocôndria dos eucariotos e no citosol dos procariotos. A citrato sintase catalisa a condensação do acetil-CoA com oxaloacetato para formar citrato. A aconitase catalisa a formação reversível do isocitrato a partir do citrato; o isocitrato é então oxidado até α-cetoglutarato pela isocitrato desidrogenase em uma reação que também libera CO_2. O α-cetoglutarato sofre outra desidrogenação e descarboxilação em succinil-CoA e CO_2. O succinil-CoA reage com o ADP (ou GDP) e P_i para formar succinato livre e ATP (ou GTP), em uma fosforilação no nível do substrato. O succinato é então oxidado em fumarato pela succinato desidrogenase, uma enzima ligada à FAD e que é parte da membrana interna da mitocôndria (ou da membrana plasmática nas bactérias). O fumarato é hidratado reversivelmente pela fumarase em L-malato, que é oxidado pela L-malato desidrogenase ligada à NAD, regenerando, afinal, o oxaloacetato. Este pode combinar-se com outra molécula de acetil-CoA e iniciar uma nova volta do ciclo.

Experimentos de marcação isotópica dos átomos de carbono de moléculas combustíveis ou moléculas de metabólitos intermediários estabeleceram que, nas células aeróbicas, o ciclo do ácido cítrico é a maior via de oxidação dos carboidratos. O complexo da piruvato desidrogenase de vertebrados é inibido pelos efetores alostéricos NADH, ATP e acetil-CoA. O complexo enzimático é também inibido pela fosforilação reversível catalisada por uma proteína quinase e uma fosfatase que são parte do complexo. A velocidade global do ciclo é controlada pela velocidade de conversão do piruvato em acetil-CoA e pelo fluxo por meio das três enzimas do ciclo: citrato sintase, isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase. Esses fluxos são determinados principalmente pelas concentrações de substratos e produtos; os produtos finais ATP e NADH são inibitórios.

Os intermediários do ciclo do ácido cítrico também são empregados como precursores na biossíntese de aminoácidos e de outras biomoléculas. Quando isso ocorre, as concentrações dos intermediários do ciclo são recolocadas em níveis normais por meio de reações anapleróticas catalisadas pela piruvato carboxilase, PEP carboxiquinase, PEP carboxilase e enzima málica. Nas sementes em germinação de algumas plantas e em alguns microrganismos que podem viver em meios cuja única fonte de carbono para a síntese de carboidrato é o acetato, entra em ação uma variante do ciclo do ácido cítrico, o ciclo do glioxalato. Esse processo envolve várias enzimas do ciclo do ácido cítrico e duas enzimas adicionais: a isocitrato liase e a malato sintase, localizadas no interior dos glioxissomos. Como esse ciclo contorna os dois passos descarboxilativos do ciclo do ácido cítrico, ele torna possível a formação *líquida* de succinato, oxaloacetato e outros intermediários do ciclo a partir de acetil-CoA. O oxaloacetato assim formado pode ser empregado na síntese de glicose por meio da gliconeogênese. Os vertebrados não possuem o ciclo do glioxalato e, por isso, não podem sintetizar a glicose por meio do acetato. Em organismos com ambos os ciclos do ácido cítrico e do glioxalato, a partição do isocitrato entre as duas vias é controlada em nível da isocitrato desidrogenase. Essa enzima está sujeita à regulação por fosforilação reversível.

Leitura Adicional

Geral

Holmes FL. (1990, 1993) *Hans Krebs, Volume 1, Formation of a Scientific Life, 1990-1993; Volume 2, Architect of Intermediary Metabolism, 1933-1937*, Oxford University Press, Oxford.

Uma biografia científica e pessoal de Krebs escrita por um eminente historiador da ciência, com uma descrição detalhada dos trabalhos que revelaram os ciclos da uréia e do ácido cítrico.

Kay J & Weitzman PDJ. (eds) (1987) *Krebs' Citric Acid Cycle: Half a Century and Still Turning*, Biochemical Society Symposium 54, The Biochemical Society, London.

Um livro de muitos autores sobre o ciclo do ácido cítrico, incluindo a genética molecular, mecanismos regulatórios, variações do ciclo em microrganismos de nichos ecológicos incomuns e evolução dessa via. Particularmente relevantes são os capítulos de H. Gest (Raízes evolucionárias do ciclo do ácido cítrico em procariotos), W.H. Holms (Controle do fluxo por meio do ciclo do ácido cítrico e o desvio do glioxalato na *Escherichia coli*) e R.N. Perham e colaboradores (Complexos de α-cetoácidos desidrogenases).

Complexo da piruvato desidrogenase

Behal RH, Buxton DB, Robertson JG, & Olson MS. (1993) Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annu Rev Nutr* 13, 497-520.

de Kok A, Hangevel AF, Martin A, & Westphal AH. (1998) The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1385. 353-366.

Roche TE & Patel MS. (eds) (1990) *Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes: Organization, Regulation, and Biomedical Ramifications. Ann NY Acad Sci* **573.**

Esse volume contém perto de 60 artigos cobrindo todos os aspectos do grupo de enzimas que inclui o complexo da piruvato desidrogenase e a α-cetoglutarato desidrogenase.

Enzimas do ciclo do ácido cítrico

Goward CR & Nicholls DJ. (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci* **3**, 1883-1888.

Uma revisão boa e curta.

Hagerhall C. (1997) Succinate: quinone oxireductases. Variations on a conserved theme. *Biochem Biophys Acta* **1320**, 107-141.

Uma revisão da estrutura e função das succinato desidrogenases.

Knowles J. (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* **58**, 195-221.

Musrati RA, Kollarova M, Mernik N, & Mikulasova D. (1998) Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol Biophys* 17, 193-210

Uma revisão curta.

Nishimura JS. (1986) Succinyl-Coa syntetase structure-function relationships and other considerations. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**, 141-172.

Remington SJ. (1992) Structure and mechanism of citrate synthase. *Curr Top Cell Regul* **33**, 209-229.

Uma revisão completa sobre essa enzima.

Singer TP & Johnson MK. (1985) The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification. *FEBS Lett* **190**, 189-198.

Uma descrição da estrutura e papel dos centros ferro-enxofre nessa enzima.

Velot C, Mixon MB, Teige M, & Srere PA. (1997) Model of a quinare structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon. *Biochemistry* **36**, 14.271-14.276.

Uma sugestão interessante de como as enzimas do ciclo podem interagir para canalizar os intermediários dentro da via.

Weigand G & Remington SJ. (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**, 97-117.

Wolodko WT, Fraser ME, James MNG, & Bridger WA. (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J Biol Chem* **269**, 10.883-10.890.

Regulação do ciclo do ácido cítrico

Hansford RG. (1980) Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr Top Bioenerget* **10**, 217-278.

Uma revisão detalhada da regulação do ciclo do ácido cítrico.

Kaplan NO. (1985) The role of pyridine nucleotides in regulating cellular metabolism. *Curr Top Cell Regul* **26**, 371-381.

Uma excelente discussão geral sobre a importância da relação [NADH]/[NAD$^+$] na regulação do metabolismo celular.

Reed LJ, Damuni Z & Merryfield ML. (1985) Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr Top Cell Regul* **27**, 41-49.

Ciclo do glioxalato

Holms WH. (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli:* relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr Top Cell Regul* **28**, 69-106.

Problemas

1. Equilíbrio do ciclo do ácido cítrico. O ciclo do ácido cítrico tem oito enzimas: citrato sintase, aconitase, isocitrato desidrogenase, α-cetoglutarato desidrogenase, succinil-CoA sintetase, succinato desidrogenase, fumarase e malato desidrogenase.

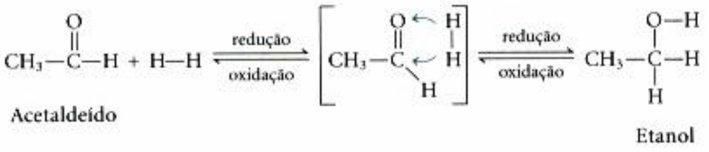
(a) Escreva uma equação balanceada para a reação catalisada por cada uma dessas enzimas.

(b) Nomei os co-fatores requeridos em cada uma dessas reações enzimáticas.

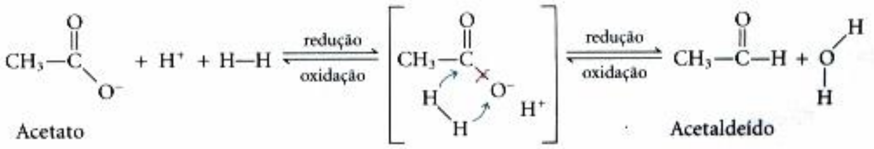
(c) Para cada enzima, determine qual dos seguintes termos descreve o tipo de reação catalisada: condensação (formação de uma ligação carbono-carbono); desidratação (perda de água); hidratação (adição de água); descarboxilação (perda de CO_2); oxidação-redução; fosforilação no nível do substrato; isomerização.

(d) Escreva uma equação líquida final balanceada do catabolismo do acetil-CoA até CO_2.

2. Reconhecendo reações de oxidação e redução. A estratégia bioquímica dos organismos vivos é a oxidação passo a passo de compostos orgânicos até dióxido de carbono e água. A maior parte da energia produzida nessa oxidação é conservada na forma de ATP, por acoplamento adequado dessas reações. Assim, é muito importante ser capaz de reconhecer processos metabólicos de oxidação-redução. A redução de uma molécula orgânica resulta da hidrogenação de uma dupla ligação (Equação 1) ou uma ligação simples com clivagem associada (Equação 2). Por outro lado, a oxidação de uma molécula orgânica resulta da desidrogenação. Nas reações bioquímicas de redox (veja Problema 3), as coenzimas NAD e FAD funcionam para desidrogenar/hidrogenar moléculas orgânicas na presença das enzimas apropriadas.

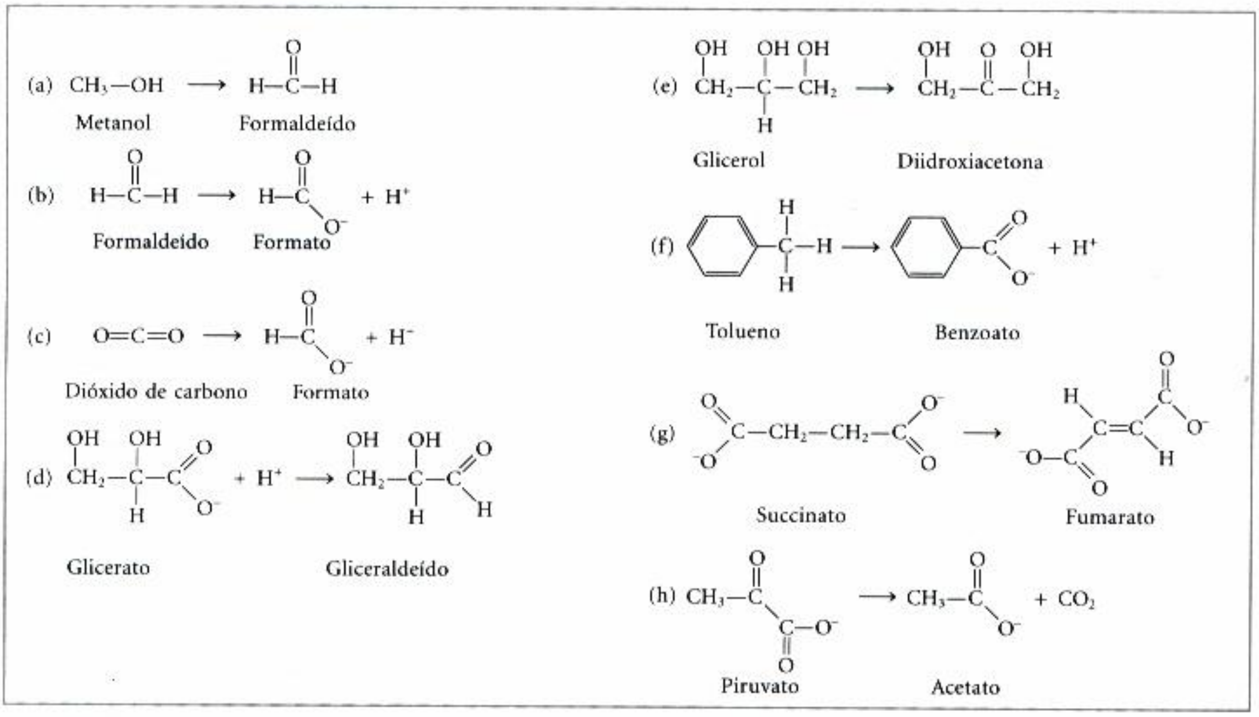


(1)



(2)

Para cada uma das transformações metabólicas mostradas a seguir (itens (a) a (f)) determine se ocorreu oxidação ou redução. Equilibre cada transformação pela inserção de H—H e H_2O onde necessário.

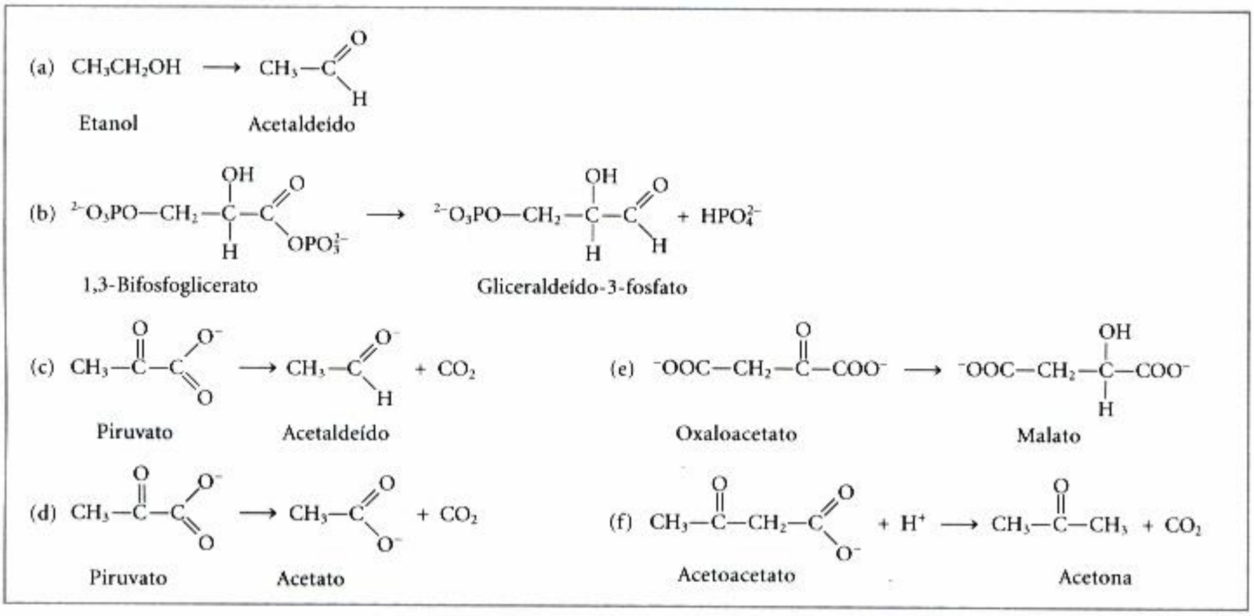

(a) Metanol → Formaldeído
(b) Formaldeído → Formato + H⁺
(c) Dióxido de carbono → Formato + H⁻
(d) Glicerato + H⁺ → Gliceraldeído
(e) Glicerol → Diidroxiacetona
(f) Tolueno → Benzoato + H⁺
(g) Succinato → Fumarato
(h) Piruvato → Acetato + CO₂

3. Relação entre liberação de energia e o estado de oxidação do átomo de carbono. Uma célula eucariota pode usar a glicose ($C_6H_{12}O_6$) e o ácido hexanóico ($C_6H_{14}O_2$) como combustíveis para a respiração celular. Com base em suas fórmulas estruturais, qual substância libera mais energia quando sofre combustão completa até CO_2 e H_2O?

4. Coenzimas da nicotinamida como transportadores redox reversíveis. As coenzimas da nicotinamida (veja Fig. 14-15) podem sofrer reações de oxidação-redução reversíveis com substratos específicos e na presença de desidrogenases apropriadas. Nestas reações, NADH + H⁺ funciona como a fonte de hidrogênio (H—H), como descrito no Problema 2. Sempre que a coenzima é oxidada, um substrato precisa ser reduzido simultaneamente:

$$\underset{\text{Oxidado}}{\text{Substrato}} + \underset{\text{Reduzido}}{\text{NADH}} + H^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Reduzido}}{\text{produto}} + \underset{\text{Oxidado}}{\text{NAD}^+}$$

Para cada uma das reações apresentadas a seguir, determine se o substrato foi oxidado ou reduzido ou se o seu estado de oxidação não variou (veja Problema 2). Para os substratos que sofreram uma variação redox, equilibre a reação com as quantidades necessárias de NAD^+, NADH, H^+ e H_2O. O objetivo é reconhecer quando uma coenzima redox é necessária em uma reação metabólica.


(a) Etanol → Acetaldeído
(b) 1,3-Bifosfoglicerato → Gliceraldeído-3-fosfato + HPO₄²⁻
(c) Piruvato → Acetaldeído + CO₂
(d) Piruvato → Acetato + CO₂
(e) Oxaloacetato → Malato
(f) Acetoacetato + H⁺ → Acetona + CO₂

5. Estímulo do consumo de oxigênio por oxaloacetato e por malato. No início da década de 1930, Albert Szent-Györgyi publicou a interessantíssima observação de que a adição de pequenas quantidades de oxaloacetato ou malato a suspensões de músculo respiratório de pombo macerado estimulava o consumo de oxigênio da preparação. Surpreendentemente, a quantidade de oxigênio consumida era sete vezes maior que a quantidade necessária para oxidar completamente o oxaloacetato e o malato adicionados a dióxido de carbono e água. Por que a adição de oxaloacetato ou malato estimula o consumo de oxigênio? Por que a quantidade de oxigênio consumida é várias vezes maior que a quantidade necessária para oxidar completamente o oxaloacetato e o malato adicionados?

6. Formação de oxaloacetato em uma mitocôndria. Na última reação do ciclo do ácido cítrico, o malato é desidrogenado para regenerar o oxaloacetato necessário para a entrada de nova molécula de acetil-CoA no ciclo:

$$\text{L-malato} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \qquad \Delta G'^{\circ} = 30\text{kJ/mol}$$

(a) Calcule a constante de equilíbrio da reação a 25°C.

(b) Como a definição de $\Delta G'^{\circ}$ assume um pH padrão de valor igual a 7, a constante de equilíbrio obtida em (a) corresponde a:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{oxaloacetato}][\text{NADH}]}{[\text{L-malato}][\text{NAD}^+]}$$

A concentração medida de L-malato na mitocôndria do fígado é cerca de 0,20mM quando a relação $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ é igual a 10. Calcule a concentração de oxaloacetato, em pH 7, nessas mitocôndrias.

(c) As mitocôndrias do fígado do rato são aproximadamente esféricas, com um diâmetro de cerca de 2μm. Para avaliar a magnitude da concentração de oxaloacetato nelas, calcule o número de moléculas de oxaloacetato em uma única mitocôndria do fígado do rato.

7. Rendimento energético do ciclo do ácido cítrico. A reação catalisada pela succinil-CoA sintetase produz o composto de alta energia GTP. Como a energia livre contida no GTP é incorporada ao conjunto celular de moléculas de ATP?

8. Estudos sobre a respiração em mitocôndrias isoladas. A respiração celular pode ser estudada empregando-se mitocôndrias isoladas e medindo seu consumo de oxigênio em diferentes condições. Se 0,01M de malonato de sódio é adicionado a mitocôndrias que respiram ativamente e utilizando piruvato como fonte de combustível, a respiração logo cessa e acumula-se um intermediário metabólico.

(a) Qual é a estrutura do intermediário que se acumula?

(b) Explique por que ele se acumula.

(c) Explique por que o consumo de oxigênio cessa.

(d) Além da remoção do malonato, como pode ser superada a inibição da respiração provocada por ele? Explique.

9. Estudos com marcação isotópica em mitocôndrias isoladas. Freqüentemente as vias metabólicas dos compostos orgânicos têm sido determinadas pelo emprego de substratos marcados radioativamente e pelo seguimento dos destinos dos átomos marcados.

(a) Como você pode determinar se a glicose adicionada a uma suspensão de mitocôndrias isoladas foi metabolizada até CO_2 e H_2O?

(b) Suponha que você adicione piruvato [3-^{14}C] (marcado na posição metil) a uma suspensão de mitocôndrias. Depois de uma volta do ciclo do ácido cítrico, qual é a localização do ^{14}C no oxaloacetato? Explique sua resposta utilizando o seguimento das pegadas do ^{14}C ao longo de seu caminho pela via. Quantas voltas do ciclo do ácido cítrico precisam ser percorridas pelo ^{14}C antes que todo o isótopo seja liberado como $^{14}CO_2$?

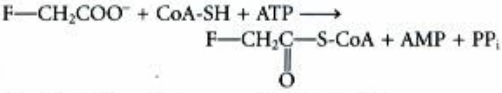
10. Catabolismo da [1-^{14}C]glicose. Se uma cultura de bactérias que está respirando ativamente é brevemente incubada com [1-^{14}C]glicose e, logo a seguir, os intermediários da glicólise e do ciclo do ácido cítrico são isolados, onde estará localizado o ^{14}C na molécula de cada um dos intermediários listados a seguir? Considere apenas a incorporação inicial do ^{14}C nessas moléculas, ou seja, a que ocorre na primeira passagem da glicose marcada por meio das vias.

(a) Frutose-1,6-bifosfato
(b) Gliceraldeído-3-fosfato
(c) Fosfoenolpiruvato
(d) Acetil-CoA
(e) Citrato
(f) α-Cetoglutarato
(g) Oxaloacetato

11. Papel da vitamina tiamina. Pessoas com beribéri, uma doença causada pela deficiência da vitamina tiamina, têm níveis elevados de piruvato e α-cetoglutarato sangüíneos, de forma especial depois de ingerirem alimentos ricos em glicose. Como esses efeitos estão relacionados com a deficiência em tiamina?

12. Síntese do oxaloacetato pelo ciclo do ácido cítrico. O oxaloacetato é formado no último passo do ciclo do ácido cítrico pela oxidação do L-malato dependente de NAD$^+$. A síntese líquida do oxaloacetato pode ocorrer a partir do acetil-CoA, empregando apenas as enzimas e co-fatores do ciclo do ácido cítrico, sem que ocorra a depleção dos intermediários do ciclo? Explique. Como é reposto o oxaloacetato transferido do ciclo para as reações biossintéticas?

13. Modo de ação do rodenticida fluoracetato. O fluoracetato, preparado comercial para o controle de roedores, é também produzido naturalmente por uma planta da África do Sul. Depois de entrar em uma célula, o fluoracetato é convertido em fluoracetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima acetato tioquinase:



$$\text{F—CH}_2\text{COO}^- + \text{CoA-SH} + \text{ATP} \longrightarrow \text{F—CH}_2\underset{\underset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}\text{—S-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

O efeito tóxico do fluoracetato foi estudado em um experimento metabólico realizado em coração isolado intacto de rato. Depois que o coração foi perfundido com uma solução 0,22mM de fluoracetato, a velocidade de captação da glicose foi medida e mostrou que, enquanto a glicólise havia diminuído, as concentrações de glicose-6-fosfato e de frutose-6-fosfato haviam aumentado. Um exame dos intermediários do ciclo do ácido cítrico indicou que suas concentrações estavam abaixo do normal, com exceção do citrato, que tinha uma concentração 10 vezes maior que a normal.

(a) Onde ocorreu o bloqueio do ciclo do ácido cítrico? O que causou o acúmulo de citrato e a depleção dos outros intermediários do ciclo?

(b) O fluoracetil-CoA é enzimaticamente transformado no ciclo do ácido cítrico. Qual é a estrutura do produto metabólico final de fluoracetato? Por que ele bloqueia o ciclo do ácido cítrico? Como essa inibição pode ser superada?

(c) Por que a captação de glicose e a glicólise diminuem no coração perfundido com fluoracetato? Por que se acumulam as hexoses monofosfato?

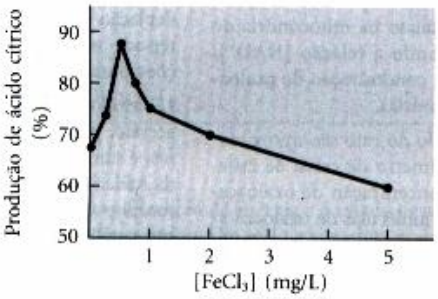
(d) Por que o envenenamento com o fluoracetato é mortal?

14. Síntese de L-malato durante a produção do vinho. A acidez de certos vinhos é devida às altas concentrações de L-malato. Escreva uma seqüência de reações mostrando como as células da levedura sintetizam L-malato da glicose sob condições anaeróbias e na presença de CO_2 dissolvido (HCO_3^-). Note que a reação final global não pode envolver o consumo de coenzimas da nicotinamida ou de intermediários do ciclo.

15. Síntese líquida final de α-cetoglutarato. O α-cetoglutarato desempenha um papel central na biossíntese de vários aminoácidos. Escreva uma série de reações enzimáticas conhecidas que, partindo do piruvato, resultem na síntese líquida de α-cetoglutarato. A seqüência proposta não pode envolver o consumo líquido de outros componentes do ciclo do ácido cítrico. Escreva a reação geral para a seqüência proposta e identifique a fonte de cada um dos reagentes.

16. Regulação da piruvato desidrogenase. Nos tecidos animais, a velocidade de transformação do piruvato em acetil-CoA é regulada pela relação entre as concentrações da piruvato desidrogenase fosforilada ativa e a piruvato desidrogenase não-fosforilada inativa. Determine o que acontece à velocidade dessa reação quando uma preparação de mitocôndrias de músculo de coelho contendo desidrogenase é tratada com: (a) piruvato desidrogenase quinase, ATP e NADH; (b) piruvato desidrogenase fosfatase e Ca^{2+}; (c) malonato.

17. Síntese comercial do ácido cítrico. O ácido cítrico é empregado como aromatizante nos refrigerantes, sucos de fruta e numerosos outros alimentos. No mundo todo, o comércio anual do ácido cítrico vale muitos milhões de dólares. A produção industrial dele emprega o fungo *Aspergillus niger* agindo sobre a sacarose sob condições cuidadosamente controladas.

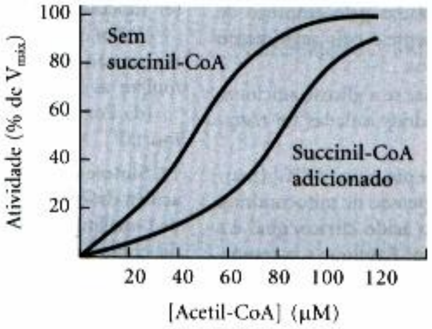


(a) O rendimento da produção de ácido cítrico depende fortemente da concentração de $FeCl_3$ no meio de cultura, como indicado no gráfico. Por que o rendimento decresce quando a concentração do íon férrico está acima ou abaixo do valor ótimo 0,5mg/L?

(b) Escreva a seqüência de reações por meio das quais o *A. niger* sintetiza ácido cítrico a partir da sacarose. Escreva uma equação para a reação global.

(c) O processo comercial exige que o meio de cultura seja aerado? Ou seja, esse processo é uma fermentação ou um processo aeróbio? Explique.

18. Regulação da citrato sintase. Na presença de quantidades saturantes de oxaloacetato, a atividade da citrato sintase do tecido cardíaco do porco mostra uma dependência sigmóide em função da concentração de acetil-CoA, como mostrado no gráfico. Quando o succinil-CoA é adicionado, a curva desloca-se para a direita e torna-se ainda mais sigmóide.



Com base nessas observações, explique como o succinil-CoA regula a atividade da citrato sintase (indicação: veja Fig. 8-26). Por que o succinil-CoA é um sinalizador adequado para a regulação do ciclo do ácido cítrico? Como a regulação da citrato sintase controla a velocidade da respiração celular no tecido cardíaco do porco?

19. Regulação da piruvato carboxilase. A carboxilação do piruvato pela piruvato carboxilase ocorre em velocidades muito baixas sem que esteja presente o acetil-CoA, um modulador alostérico positivo. Quando você termina uma refeição rica em ácidos graxos (triacilgliceróis), mas pobre em carboidratos (glicose), como essa propriedade regulatória diminui a oxidação da glicose a CO_2 e H_2O, mas aumenta a oxidação do acetil-CoA derivado de ácidos graxos?

20. Relação entre respiração e o ciclo do ácido cítrico. Embora o oxigênio não participe diretamente do ciclo do ácido cítrico, este último opera apenas quando o O_2 está presente. Por quê?

21. Regulação do metabolismo no músculo esquelético do coelho. O consumo intracelular de glicose e de glicogênio é estreitamente regulado em quatro pontos. Para comparar a regulação da glicólise quando o oxigênio é abundante e quando ele está em pequena concentração, considere a utilização da glicose e do glicogênio pelo músculo da perna do coelho em duas condições fisiológicas: em um coelho em repouso, com necessidade de ATP pequena, e em um coelho que encontra seu inimigo mortal, o coiote, e precisa correr em busca de esconderijo. Para cada situação, determine os níveis relativos (alto, intermediário, baixo) de AMP, ATP, citrato e acetil-CoA e como esses níveis afetam o fluxo de metabólitos por meio da glicólise pela regulação de enzimas específicas. (Em períodos de estresse, o músculo da perna do coelho produz a maior parte de seu ATP por glicólise anaeróbia (fermentação do ácido láctico) e muito pouco por oxidação do acetil-CoA derivado da quebra das gorduras.)

22. Regulação do metabolismo em pássaros migratórios. Diferentemente do coelho em sua corrida curta, os pássaros migratórios necessitam de fornecimento de energia por períodos longos. Por exemplo, os patos em geral voam vários milhares de quilômetros durante sua migração anual. Os músculos das asas de aves migratórias possuem uma capacidade oxidativa alta e obtêm o ATP que necessitam pela oxidação do acetil-CoA (obtido de gorduras) via ciclo do ácido cítrico. Compare a regulação da glicólise durante a atividade curta mas intensa que ocorre no coelho em fuga com aquela de longa duração que ocorre no pato em migração. Por que a regulação deve ser diferente nessas duas condições?

23. Termodinâmica das reações da citrato sintase nas células. O citrato é formado pela condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato, catalisado pela citrato sintase:

$$\text{Oxaloacetato} + \text{acetil-CoA} + H_2O \longrightarrow \text{citrato} + \text{CoA} + H^+$$

Na mitocôndria do coração de ratos em pH 7,0 e 25°C, as concentrações de reagentes e produtos são: oxaloacetato, 1μM; acetil-CoA 1μM; citrato 220μM; e CoA 65μM. Com base nessas concentrações e no valor da energia livre padrão para a reação da citrato sintase (−32,2kJ/mol), determine a direção do fluxo metabólico por meio da reação da citrato sintase nas células do coração do rato. Explique.

24. Reações do complexo da piruvato desidrogenase. Dois dos passos na descarboxilação oxidativa do piruvato (passos ④ e ⑤, Fig. 16-6) não envolvem nenhum dos três átomos de carbono do piruvato, apesar de eles serem essenciais para a operação do complexo da piruvato desidrogenase. Explique.

CAPÍTULO 17

A Oxidação dos Ácidos Graxos

A oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa em acetil-CoA é uma via central liberadora de energia nos animais, em muitos protistas e em algumas bactérias. Os elétrons removidos, durante a oxidação dos ácidos graxos, passam através da cadeia respiratória mitocondrial e a energia assim liberada é empregada na síntese de ATP. O produto dessa oxidação, o acetil-CoA, pode ser completamente oxidado até CO_2 por meio do ciclo do ácido cítrico, resultando na conservação de mais energia. Em alguns organismos e em alguns tecidos, o acetil-CoA produzido pela oxidação dos ácidos graxos tem destinos alternativos. No fígado, o acetil-CoA pode ser convertido em corpos cetônicos — combustíveis hidrossolúveis exportados para o cérebro e outros tecidos, quando a glicose não está disponível. Nos vegetais superiores, o acetil-CoA serve principalmente como precursor biossintético e apenas de forma secundária como combustível. Embora o papel biológico da oxidação dos ácidos graxos seja diferente de organismo para organismo, o mecanismo dela é essencialmente o mesmo. Este capítulo está centrado nesse processo repetitivo de quatro passos chamado **β-oxidação**, por meio do qual os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA.

No Capítulo 11 descrevemos as propriedades dos triacilgliceróis (também chamados triglicerídeos ou gorduras neutras) que os fazem especialmente apropriados para funcionar como combustíveis de armazenamento. As longas cadeias alquila dos ácidos graxos que formam suas estruturas são, em essência, hidrocarbonetos, estruturas altamente reduzidas e com uma energia de oxidação completa (~38kJ/g), mais de duas vezes aquela derivada do mesmo peso de carboidratos ou proteínas. Devido à sua hidrofobicidade e extrema insolubilidade em água, os triacilgliceróis são segregados em gotículas lipídicas, as quais não aumentam a osmolaridade do citosol e, diferentemente dos polissacarídeos, não contêm peso extra como água de solvatação. A relativa inércia química dos triacilgliceróis permite sua estocagem intracelular em grandes quantidades sem o risco de ocorrerem reações químicas não desejadas com outros componentes celulares.

As mesmas propriedades que fazem dos triacilgliceróis excelentes substâncias para armazenamento representam problemas quando eles desempenham o papel de combustíveis. Devido à sua insolubilidade em água, os triacilgliceróis ingeridos precisam ser emulsificados antes de serem digeridos pelas enzimas intestinais hidrossolúveis, e os triacilgliceróis absorvidos no intestino, ou mobilizados dos tecidos de reserva, para serem transportados pelo sangue precisam estar ligados a proteínas que contrabalancem sua insolubilidade. A relativa estabilidade das ligações C—C em um ácido graxo é sobrepujada pela ativação do grupo carboxila em C-1 por meio da ligação da coenzima A, que permite a oxidação passo a passo do grupo acil-graxo na posição C-3 ou posição β, daí o nome β-oxidação.

Sucesso na maratona requer treino, estratégia, força de vontade e um suprimento constante de energia para potencializar os músculos. Os corredores de longas distâncias conseguem a energia de que necessitam pela oxidação das gorduras nas vias metabólicas descritas neste capítulo.

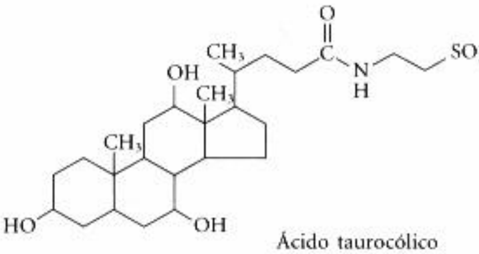
Iniciamos este capítulo com uma breve discussão sobre as fontes de ácidos graxos e os caminhos pelos quais eles são transportados até o sítio de sua oxidação, com ênfase especial para esses processos nos vertebrados; descrevemos, a seguir, os passos químicos da oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias. Nesse processo podemos distinguir três estágios: a oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa em fragmentos de dois carbonos, na forma de acetil-CoA, a β-oxidação; a oxidação do acetil-CoA em CO_2, por meio do ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16); e a transferência de elétrons dos transportadores reduzidos de elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial (Capítulo 19). Neste capítulo enfatizamos o primeiro desses estágios. Iniciamos considerando o caso simples, no qual um ácido graxo totalmente saturado e com um número par de átomos de carbono é degradado até acetil-CoA, depois veremos brevemente as transformações extras, necessárias para a mesma degradação de ácidos graxos insaturados e de ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono. Finalmente, discutiremos as variações do tema da β-oxidação que ocorre nas organelas especializadas — peroxissomos e glioxissomos. O capítulo conclui com a descrição de um destino alternativo para o acetil-CoA formado por β-oxidação nos vertebrados: a produção de corpos cetônicos no fígado.

Digestão, Mobilização e Transporte dos Ácidos Graxos

As células podem obter ácidos graxos combustíveis de três fontes: gorduras ingeridas na alimentação; gorduras armazenadas nas células na forma de gotículas gordurosas; gorduras sintetizadas em um órgão para serem exportadas para outro. Alguns organismos usam todas as três fontes em várias circunstâncias, enquanto outros obtêm ácidos graxos de apenas uma ou duas dessas fontes. Os vertebrados, por exemplo, obtêm gorduras pela ingestão delas na alimentação, mobilizam gorduras armazenadas em tecido especializado (tecido adiposo, consistindo este de células chamadas adipócitos) e, no fígado, convertem o excesso de carboidratos da alimentação em gorduras, exportando-as para outros tecidos. Em média, nos países altamente industrializados, 40% ou mais da energia diária necessária a um ser humano é suprida pelos triacilgliceróis alimentares (embora a maioria dos guias científicos nutricionais recomendem que não mais do que 30% da ingestão calórica diária seja constituída por gorduras). Os triacilgliceróis fornecem mais da metade das necessidades energéticas de alguns órgãos, particularmente do fígado, coração e músculo esquelético em repouso. Os triacilgliceróis armazenados são virtualmente a única fonte de energia dos animais em hibernação e dos pássaros durante a migração. Os protistas obtêm gorduras pelo consumo de organismos situados mais abaixo na cadeia alimentar, e alguns também armazenam gorduras em gotículas lipídicas citosólicas. As plantas superiores mobilizam as gorduras armazenadas em suas sementes, durante o processo de germinação, mas não dependem de gorduras para a obtenção de energia.

As gorduras da dieta são absorvidas no intestino delgado

Para serem absorvidos, através da parede intestinal, os triacilgliceróis ingeridos precisam ser convertidos de partículas gordurosas macroscópicas insolúveis em micelas microscópicas finamente dispersas. Os sais biliares, como o ácido taurocólico, são sintetizados no fígado a partir do colesterol, estocados na vesícula biliar e, depois da ingestão de uma refeição gordurosa, liberados no intestino delgado. Esses compostos anfipáticos agem como detergentes biológicos convertendo as gorduras alimentares em micelas mistas de sais biliares e triacilgliceróis (Fig. 17-1, passo ①). A formação de micelas aumenta enormemente a fração de moléculas lipídicas acessíveis à ação das lipases hidrossolúveis no intestino, e a ação dessas lipases converte os triacilgliceróis em monoacilgliceróis (monoglicerídeos), diacilgliceróis (diglicerídeos), ácidos graxos livres e glicerol (passo ②). Esses produtos da ação das lipases se difundem para o interior das células epiteliais que recobrem a superfície intestinal interna (mucosa intestinal) (passo ③), onde eles são reconvertidos em triacilgliceróis e agrupados com o colesterol da dieta e com proteínas específicas, formando agregados lipoprotéicos chamados **quilomícrons** (Fig. 17-2; veja também a Fig. 17-1, passo ④).



Ácido taurocólico

As **apolipoproteínas** são proteínas existentes no sangue, que se ligam aos lipídios; elas são responsáveis pelo transporte dos triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol e ésteres do colesterol entre os vários órgãos. As apolipoproteínas ("apo" designa a fração de proteína na sua forma livre de lipídios) podem combinar-se com vários tipos de lipídios para formar várias classes de partículas lipoprotéicas, estas são agregados esféricos com lipídios hidrofóbicos no centro e, na superfície, as cadeias laterais protéicas hidrofílicas e os grupos iônicos dos lipídios. As várias combinações possíveis de lipídios e proteínas produzem partículas de densidades diferentes, variando dos quilomícrons e das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL — "very low density lipoprotein") até lipoproteínas de alta densidade (VHDL — "very high density lipoprotein"), todas elas podendo ser separadas entre si por ultracentrifugação. As estruturas e os papéis dessas partículas lipoprotéicas no transporte de lipídios são estudados em detalhes no Capítulo 21.

As porções protéicas das lipoproteínas são reconhecidas por receptores existentes na superfície celular. Na captação dos lipídios do intestino, os quilomícrons que contêm a apolipoproteína C-II (apoC-II) movem-se da mucosa intestinal para o sistema linfático, de onde saem para a corrente sangüínea e são transportados para os músculos e para o tecido adiposo (Fig. 17-1, passo ⑤). Nos capilares desses tecidos, a enzima extracelular **lipase lipoprotéica** é ativada pela apoC-II. Essa enzima hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (passo ⑥), que são captados pelas células dos tecidos-alvo (passo ⑦). Nos músculos, os ácidos graxos são oxidados para obtenção de energia; no tecido adiposo, eles são reesterificados e armazenados como triacilgliceróis (passo ⑧).

Os remanescentes dos quilomícrons desprovidos da maior parte dos seus triacilgliceróis, mas ainda contendo colesterol e as apolipoproteínas, viajam pelo sangue até o fígado, onde eles são captados por endocitose mediada por receptores para suas lipoproteínas. Os triacilgliceróis que entram no fígado por essa via podem ser oxidados para fornecer energia ou precursores para a síntese de corpos cetônicos, como será descrito depois neste capítulo. Quando a dieta contém uma quantidade de ácidos graxos maior que aquela imediatamente necessária como combustível, ou como precursores, eles são convertidos em triacilgliceróis no fígado e estes são agrupados com apolipoproteínas específicas em VLDLs. Essas VLDLs são transportadas pelo sangue do fígado até o tecido adiposo, onde os triacilgliceróis são absorvidos e armazenados como gotículas lipídicas no interior dos adipócitos.

Alguns hormônios desencadeiam a mobilização dos triacilgliceróis armazenados

Quando certos hormônios sinalizam que o organismo está necessitando de energia metabólica, os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são mobilizados (quer dizer, retirados da armazenagem e hidrolisados) e transportados para aqueles tecidos (músculo esquelético, coração e córtex renal) nos quais os ácidos graxos podem ser oxidados para a produção de energia.

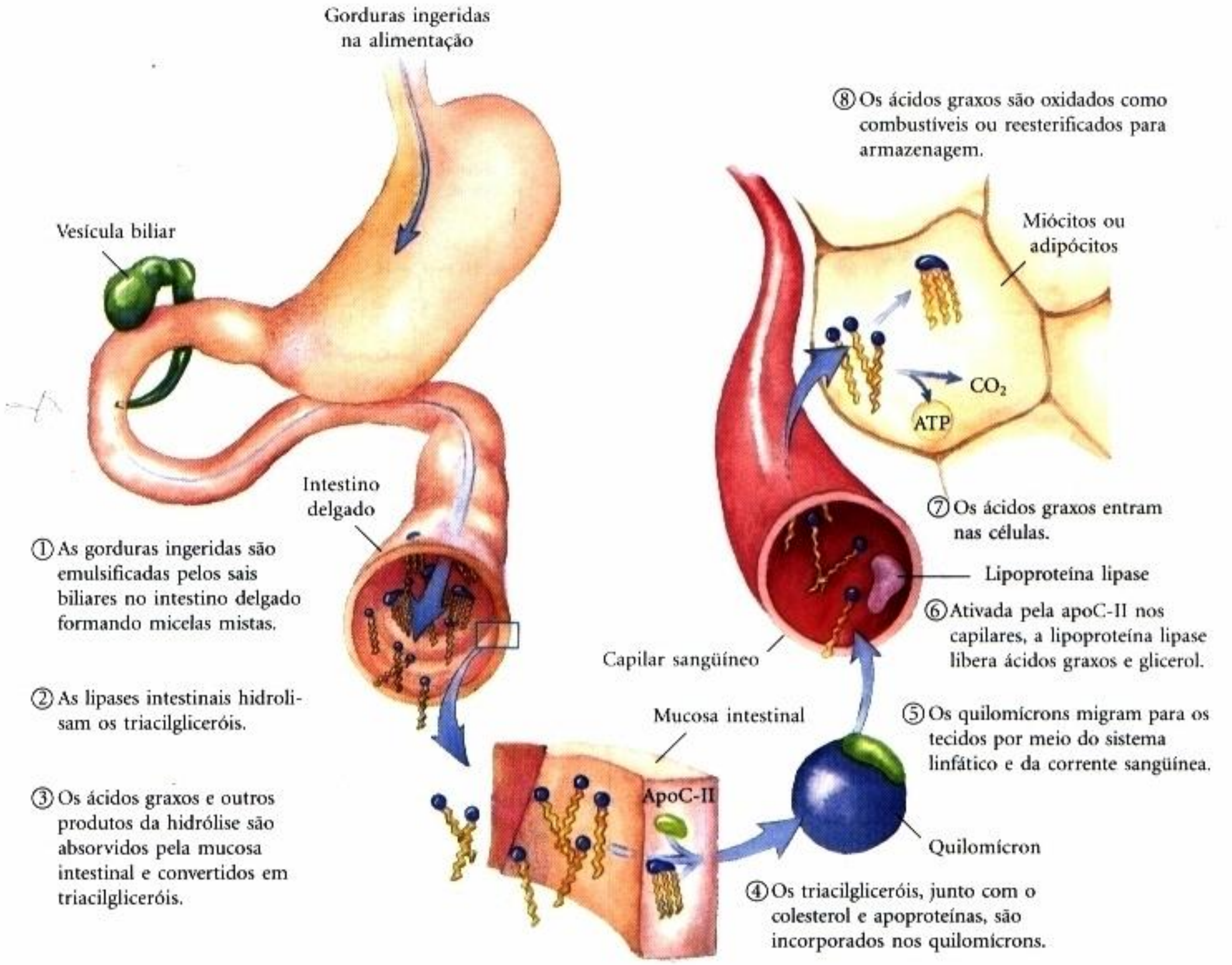

Gorduras ingeridas na alimentação
Vesícula biliar
Intestino delgado
① As gorduras ingeridas são emulsificadas pelos sais biliares no intestino delgado formando micelas mistas.
② As lipases intestinais hidrolisam os triacilgliceróis.
③ Os ácidos graxos e outros produtos da hidrólise são absorvidos pela mucosa intestinal e convertidos em triacilgliceróis.
Mucosa intestinal
ApoC-II
④ Os triacilgliceróis, junto com o colesterol e apoproteínas, são incorporados nos quilomícrons.
Quilomícron
⑤ Os quilomícrons migram para os tecidos por meio do sistema linfático e da corrente sangüínea.
Capilar sangüíneo
Lipoproteína lipase
⑥ Ativada pela apoC-II nos capilares, a lipoproteína lipase libera ácidos graxos e glicerol.
⑦ Os ácidos graxos entram nas células.
Miócitos ou adipócitos
CO_2
ATP
⑧ Os ácidos graxos são oxidados como combustíveis ou reesterificados para armazenagem.

Figura 17-1 – Processamento dos lipídios alimentares em vertebrados. A digestão e a absorção dos lipídios ingeridos ocorrem no intestino delgado, e os ácidos graxos liberados dos triacilgliceróis são reunidos e enviados para os músculos e tecido adiposo. Os oito passos são descritos no texto.

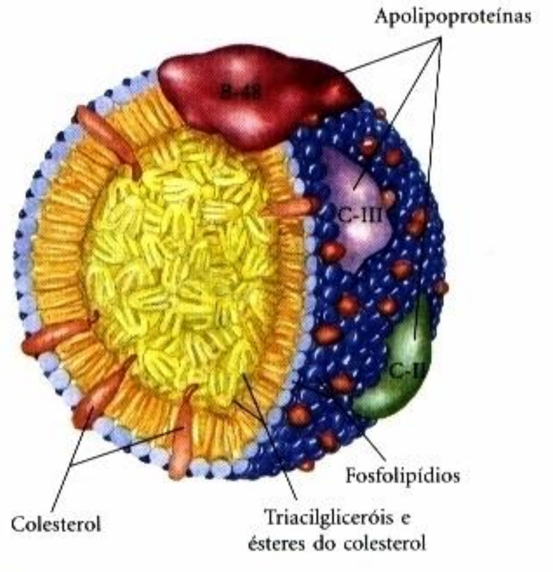

Apolipoproteínas
B-48
C-III
C-II
Fosfolipídios
Colesterol
Triacilgliceróis e ésteres do colesterol

Figura 17-2 – Estrutura molecular de um quilomícron. A superfície é uma camada de fosfolipídios com grupos cabeça fazendo face para a fase aquosa. Os triacilgliceróis seqüestrados no interior (amarelo) perfazem mais de 80% da massa total. Várias apolipoproteínas que protruem da superfície (B-48, C-III e C-II) agem como sinais na captação e metabolismo do conteúdo dos quilomícrons. O diâmetro de um quilomícron varia de 100 a aproximadamente 500nm.

Os hormônios epinefrina e glucagon, secretados em resposta a níveis baixos de glicose no sangue, ativam a adenilato ciclase na membrana plasmática do adipócito (Fig. 17-3), aumentando a concentração intracelular de um segundo mensageiro, o AMP cíclico (cAMP). Por sua vez, uma proteína quinase, dependente de cAMP, fosforila e, assim, ativa a **lipase de triacilgliceróis hormônio-sensível**, a qual catalisa a hidrólise de ligações ésteres dos triacilgliceróis. Os ácidos graxos assim liberados passam do interior do adipócito para o sangue, onde se ligam à proteína **albumina ou soroalbumina**. Essa proteína (M_r 62.000) constitui perto de metade das proteínas do soro sangüíneo e, por meio de interações não-covalentes, liga perto de 10 moléculas de ácidos graxos por monômero. Ligados a essa proteína solúvel, os ácidos graxos, de outra forma insolúveis, são transportados para os tecidos como o músculo esquelético, o coração e o córtex renal. Neles, os ácidos graxos dissociam-se da albumina e difundem-se para o citosol das células nas quais servirão como combustível.

Perto de 95% da energia biologicamente disponível dos triacilgliceróis reside em seus três ácidos graxos de cadeia longa; apenas 5% é fornecida pelo glicerol. O glicerol liberado pela ação da lipase é fosforilado pela **glicerol quinase** (Fig. 17-4) e resulta em glicerol-3-fosfato, que é oxidado em diidroxiacetona fosfato. A enzima glicolítica triose fosfato isomerase converte esse composto em gliceraldeído-3-fosfato, que é oxidado por meio da via glicolítica.

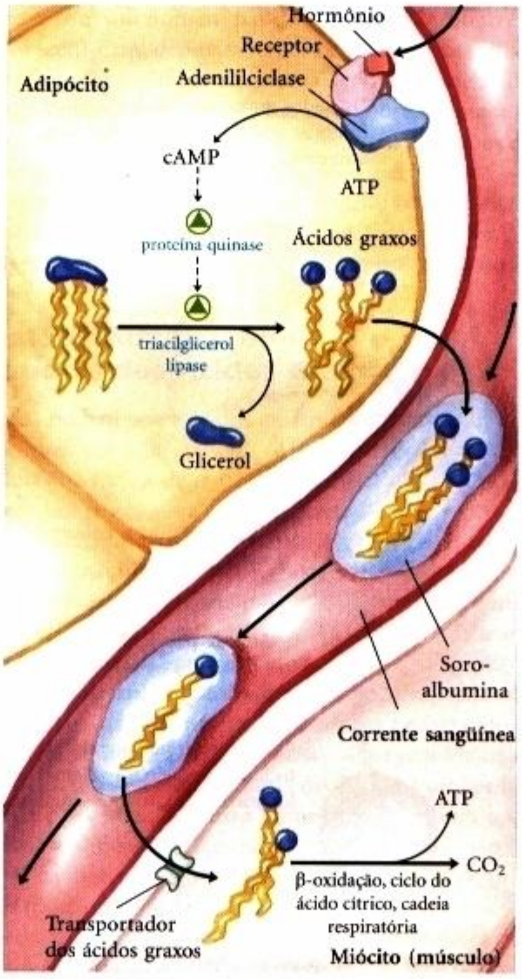

Hormônio
Receptor
Adipócito
Adenililciclase
cAMP
ATP
proteína quinase
Ácidos graxos
triacilglicerol lipase
Glicerol
Soro-albumina
Corrente sangüínea
ATP
CO₂
β-oxidação, ciclo do ácido cítrico, cadeia respiratória
Transportador dos ácidos graxos
Miócito (músculo)

Figura 17-3 – Mobilização dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo. Níveis baixos de glicose no sangue acionam a mobilização dos triacilgliceróis por meio da ação da epinefrina e do glucagon sobre a adenililciclase dos adipócitos. Os passos subseqüentes da mobilização estão descritos no texto.

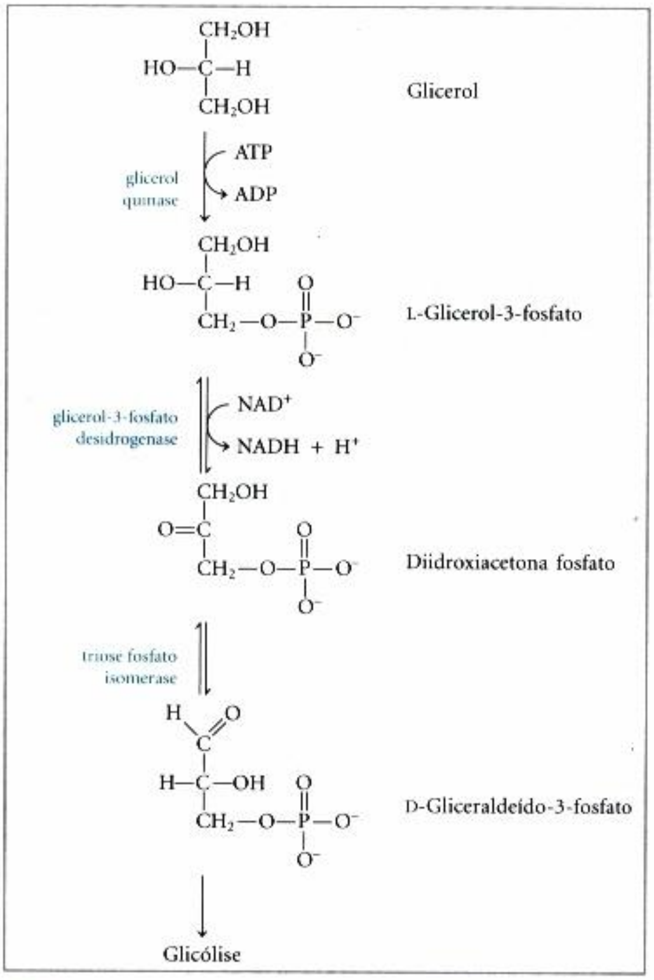

Glicerol
ATP
glicerol quinase
ADP
L-Glicerol-3-fosfato
NAD⁺
glicerol-3-fosfato desidrogenase
NADH + H⁺
Diidroxiacetona fosfato
triose fosfato isomerase
D-Gliceraldeído-3-fosfato
Glicólise

Figura 17-4 – Entrada do glicerol na via glicolítica.

Os ácidos graxos são ativados e transportados para o interior das mitocôndrias

As enzimas da oxidação dos ácidos graxos nas células dos animais estão localizadas na matriz mitocondrial, como Eugene P. Kennedy e Albert Lehninger demonstraram, em 1948. Os ácidos graxos livres que, provindos do sangue, entram no citosol das células não podem passar diretamente para o interior das mitocôndrias, através de suas membranas, sem sofrerem antes uma série de três reações enzimáticas. A primeira é catalisada por uma família de isoenzimas presentes na membrana mitocondrial externa, as **acil-CoA sintetases**, que promovem a reação geral:

$$\text{Ácido graxo} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{acil-CoA graxo} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

As diferentes isozimas da acil-CoA sintetase agem nos ácidos graxos de cadeias curta, intermediária e longa. A acil-CoA sintetase catalisa a formação de uma ligação tioéster entre o grupo carboxila do ácido graxo e o grupo tiol da coenzima A para liberar um **acil-CoA graxo**; ao mesmo tempo, o ATP sofre clivagem em AMP e PP_i. Lembre-se da descrição dessa reação, no Capítulo 14, para ilustrar como a energia livre liberada pela clivagem no ATP da ligação de anidrido do ácido fosfórico pode ser acoplada à formação de um composto de alta energia (veja Fig. 14-11). A reação ocorre em dois passos e envolve um intermediário acil-adenilato graxo (Fig. 17-5).

Os derivados acil-CoA graxos, da mesma forma que o acetil-CoA, são compostos de alta energia; a hidrólise deles até ácidos graxos e CoA tem uma variação de energia livre padrão elevada e negativa ($\Delta G'^{\circ} \approx -31\text{kJ/mol}$). A formação dos acil-CoA graxos é favorecida pela hidrólise de *duas* ligações de alta energia do ATP; o pirofosfato formado na reação de ativação é imediatamente hidrolisado por uma segunda enzima, uma pirofosfatase inorgânica (à esquerda na Fig. 17-5), que força a reação de ativação precedente na direção da formação do acil-CoA graxo. A reação global é:

$$\text{Ácido graxo} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acil-CoA graxo} + \text{AMP} + 2\text{P}_i \qquad (17\text{-}1)$$

$$\Delta G'^{\circ} = -34\text{kJ/mol}$$

Os ésteres dos acil-CoA graxos formados na membrana mitocondrial externa não cruzam a membrana mitocondrial interna intacta. Assim, o grupo acil-graxo é transientemente ligado ao grupo hidroxila da **carnitina**, formando o derivado acil-graxo carnitina. Essa transesterificação é catalisada pela **carnitina aciltransferase I**, presente na face externa da membrana interna. O éster acil-carnitina graxo cruza a membrana mitocondrial interna e chega à matriz por difusão facilitada por meio do **transportador acil-carnitina/carnitina** (Fig. 17-6).

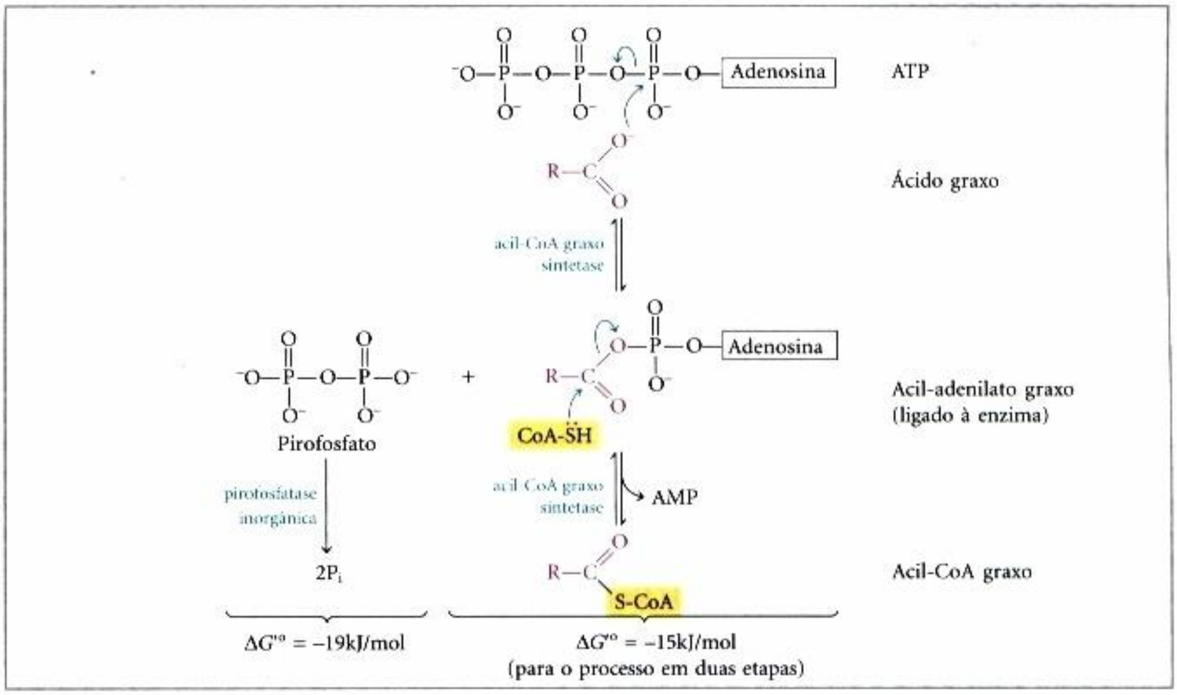

ATP
Adenosina
Ácido graxo
acil-CoA graxo sintetase
Acil-adenilato graxo (ligado à enzima)
Pirofosfato
CoA-SH
AMP
pirofosfatase inorgânica
$2P_i$
Acil-CoA graxo
S-CoA
$\Delta G'^{\circ} = -19$kJ/mol
$\Delta G'^{\circ} = -15$kJ/mol (para o processo em duas etapas)

Figura 17-5 – Conversão de um ácido graxo em um acil-CoA graxo. Esta conversão é catalisada pelas enzimas acil-CoA sintetase e pirofosfatase inorgânica. A ativação dos ácidos graxos por formação de derivados acil-CoA graxos ocorre em dois passos. Primeiro, o íon carboxilato desloca os dois fosfatos externos do ATP (β e γ) para formar um acil-adenilato graxo, o anidrido misto de um ácido carboxílico e um ácido fosfórico. O outro produto é o PP_i, um excelente grupo de saída que é imediatamente hidrolisado em dois P_i, forçando a reação a deslocar-se na direção seguinte. O grupo tiol da coenzima A faz um ataque nucleofílico ao anidrido misto ligado à enzima, deslocando o AMP e formando o tioéster acil-CoA graxo. A reação global é altamente exergônica.

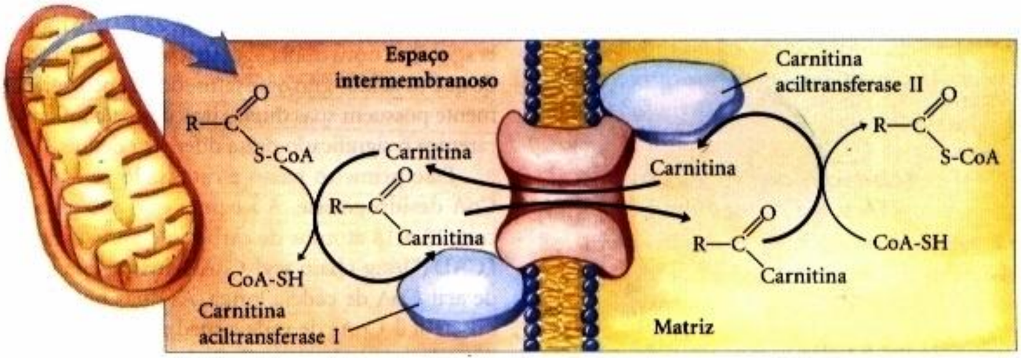
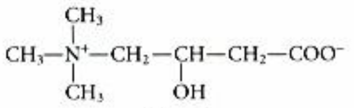

Espaço intermembranoso
Carnitina aciltransferase II
R—C(=O)S-CoA
Carnitina
R—C(=O)Carnitina
CoA-SH
Carnitina aciltransferase I
Matriz

Figura 17-6 – Entrada dos ácidos graxos no interior da mitocôndria por meio do transportador de acil-carnitina/carnitina. Depois de sua formação na superfície externa da membrana mitocondrial interna, a acil-carnitina move-se para o interior da matriz por difusão facilitada por meio do transportador. Uma vez na matriz, o grupo acila é transferido para o CoA, liberando a carnitina para voltar ao espaço intramembranoso por meio do mesmo transportador. As enzimas aciltransferase I e II estão ligadas, respectivamente, às superfícies externa e interna da membrana mitocondrial interna. A aciltransferase I é inibida por malonil-CoA, o primeiro intermediário na síntese dos ácidos graxos (veja Fig. 21.1). Essa inibição impede que os ácidos graxos sejam sintetizados e degradados ao mesmo tempo.



$CH_3-N^+(CH_3)_2-CH_2-CH(OH)-CH_2-COO^-$

Carnitina

No terceiro e último passo do processo de entrada, o grupo acil-graxo é transferido enzimaticamente da carnitina para a coenzima A intramitocondrial pela **carnitina aciltransferase** II. Essa isoenzima está localizada na face interna da membrana mitocondrial interna, onde ela regenera o acil-CoA graxo e o libera, juntamente com a carnitina livre, na matriz mitocondrial (Fig. 17-6). A carnitina reentra no espaço entre as membranas mitocondriais interna e externa por meio do transportador acil-carnitina/carnitina.

Esse processo de transferência em três passos dos ácidos graxos para a mitocôndria — esterificação com a CoA, transesterificação com a carnitina seguida por transporte e nova transesterificação com a CoA — une dois conjuntos separados e diferentes da coenzima A: um no citosol e outro na mitocôndria, que possuem funções diferentes. O conjunto na matriz mitocondrial é largamente empregado na degradação oxidativa do piruvato, de ácidos graxos e de alguns aminoácidos, enquanto o conjunto citosólico da coenzima A é empregado na biossíntese de ácidos graxos (veja Fig. 21-11).

O processo de entrada mediado pela carnitina é o passo limitante da velocidade de oxidação dos ácidos graxos no interior da mitocôndria e, como será exposto depois neste capítulo, é um ponto de regulação. Uma vez no interior da mitocôndria, o acil-CoA graxo sofre rapidamente a ação de um conjunto de enzimas existentes na matriz.

β-Oxidação

Como já explicado, a oxidação mitocondrial dos ácidos graxos ocorre em três estágios (Fig. 17-7). No primeiro estágio — β-oxidação — os ácidos graxos sofrem a remoção oxidativa de sucessivas unidades de dois átomos de carbono na forma de acetil-CoA, começando pela extremidade carboxila da cadeia do ácido graxo. Por exemplo, o ácido palmítico (palmitato em pH 7,0), o ácido graxo com cadeia de 16 átomos de carbono, sofre sete passagens por meio dessa seqüência oxidativa, perdendo, em cada uma dessas passagens, 2 átomos de carbono como acetil-CoA. Ao final dos sete ciclos, os últimos 2 carbonos do palmitato (originalmente C-15 e C-16) estão na forma de acetil-CoA. O resultado final é a conversão da cadeia de 16 átomos de carbono do palmitato em 8 moléculas de acetil-CoA, cada uma com 2 carbonos. A formação de cada molécula de acetil-CoA requer a ação de desidrogenases para a remoção de 4 átomos de hidrogênio (dois pares de elétrons e 4 H^+) da porção acil-graxo da molécula.

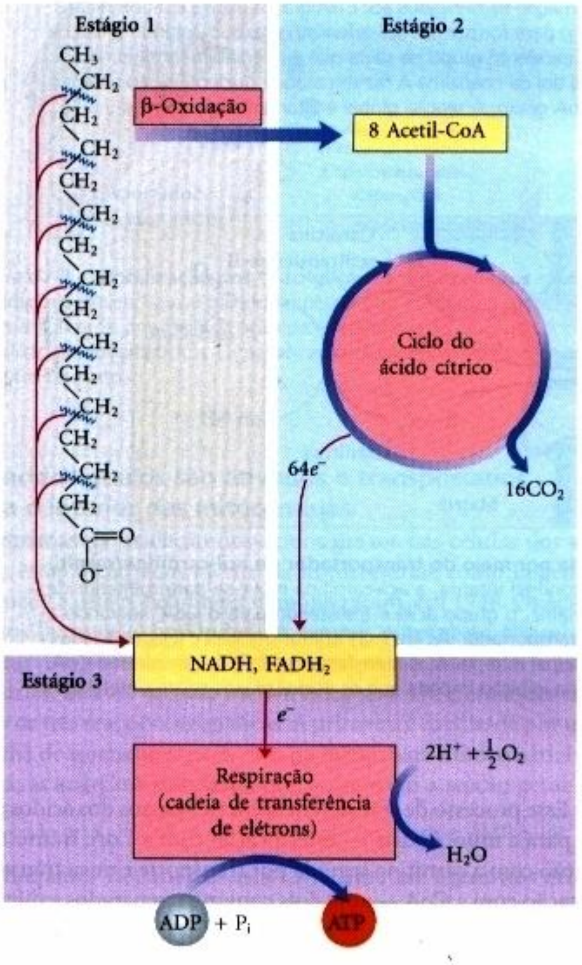


Figura 17-7 – Estágios da oxidação dos ácidos graxos. Estágio 1: um ácido graxo de cadeia longa é oxidado para produzir resíduos acetila na forma de acetil-CoA. Esse processo é chamado de β-oxidação. Estágio 2: os resíduos acetila são oxidados até CO_2 por meio do ciclo do ácido cítrico. Estágio 3: os elétrons provenientes das oxidações ocorridas nos estágios 1 e 2 são passados para o O_2 por meio da cadeia respiratória mitocondrial, fornecendo a energia para síntese do ATP por meio da fosforilação oxidativa.

No segundo estágio da oxidação do ácido graxo, os resíduos acetila do acetil-CoA são oxidados até CO_2, por meio do ciclo do ácido cítrico, processo que também ocorre na matriz mitocondrial. As moléculas de acetil-CoA derivadas da oxidação dos ácidos graxos entram nessa via final de oxidação juntamente com as moléculas de acetil-CoA derivadas da glicose, por meio da glicólise e da oxidação do piruvato (veja Fig. 16-1).

Os primeiros dois estágios do processo de oxidação de um ácido graxo produzem os transportadores de elétrons reduzidos NADH e $FADH_2$ que, em um terceiro estágio, transferem os elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial, por meio da qual esses elétrons são transportados até o oxigênio com a fosforilação concomitante do ADP para ATP (Fig. 17-7). Assim, a energia liberada pela oxidação dos ácidos graxos é conservada como ATP.

Passamos agora a estudar com mais detalhes o primeiro estágio da oxidação dos ácidos graxos, começando pelo caso mais simples dos ácidos com cadeia saturada e com número par de átomos de carbono, depois examinaremos os casos um pouco mais complicados dos ácidos graxos insaturados e aqueles com número ímpar de átomos de carbono em sua cadeia. A seguir, consideraremos a regulação da oxidação dos ácidos graxos e o processo β-oxidativo que ocorre em outras organelas que não as mitocôndrias.

A β-oxidação dos ácidos graxos saturados possui quatro passos básicos

Quatro reações catalisadas por enzimas estão envolvidas no primeiro estágio da oxidação dos ácidos graxos (Fig. 17-8a). Primeiro, uma desidrogenação produz uma dupla ligação entre os átomos de carbono α e β (C-2 e C-3), liberando um ***trans*-Δ^2-enoil-CoA**. O símbolo Δ^2 designa a posição da dupla ligação (a nomenclatura dos ácidos graxos está descrita na pág. 280 e será muito proveitoso revê-la agora). A nova dupla ligação tem a configuração *trans*; lembre-se de que os ácidos graxos insaturados de ocorrência natural normalmente possuem suas duplas ligações na configuração *cis*. Consideraremos o significado dessa diferença depois.

Esse primeiro passo é catalisado por três isozimas da **acil-CoA desidrogenase**. A isozima que age sobre os ácidos graxos com 12 a 18 átomos de carbono é abreviadamente chamada de LCAD ("long-chain acyl-CoA dehydrogenase") ou desidrogenase de acil-CoA de cadeia longa. As duas outras isozimas agem sobre os acil-CoAs de cadeia média (MCDA) entre 4 e 14 átomos de carbono e sobre os acil-CoAs de cadeia curta (SCDA) com 4 a 8 átomos de carbono. Todas as três coenzimas têm o FAD como grupo prostético (veja Fig. 14-16). Os elétrons removidos do acil-CoA graxo são transferidos para o FAD e a forma reduzida da desidrogenase os transfere imediatamente para um transportador de elétrons, a **flavoproteína transportadora de elétrons** (ETF — "Electron-Transferring Flavoprotein") (veja Fig. 19-8). A oxidação catalisada pela acil-CoA desidrogenase é análoga à desidrogenação do succinato no ciclo do ácido cítrico (pág. 450); nas duas reações as respectivas enzimas estão ligadas na membrana mitocondrial interna, uma dupla ligação é introduzida entre os carbonos α e β do ácido carboxílico, o FAD é o receptor de elétrons e estes, em última instância, entram na cadeia respiratória e são transportados até o O_2 com a síntese concomitante de 1,5 molécula de ATP por par de elétrons.

No segundo passo da seqüência de oxidação do ácido graxo (Fig. 17-8a), uma molécula de água é adicionada à dupla ligação do *trans*-Δ^2-enoil-CoA para formar o estereoisômero L do **β-hidroxiacil-CoA** (também designado **3-hidroxiacil-CoA**). Essa reação, catalisada pela **enoil-CoA hidratase**, é formalmente análoga à reação da fumarase no ciclo do ácido cítrico; nela a adição de H_2O é feita por meio de uma dupla ligação α-β (pág. 450).

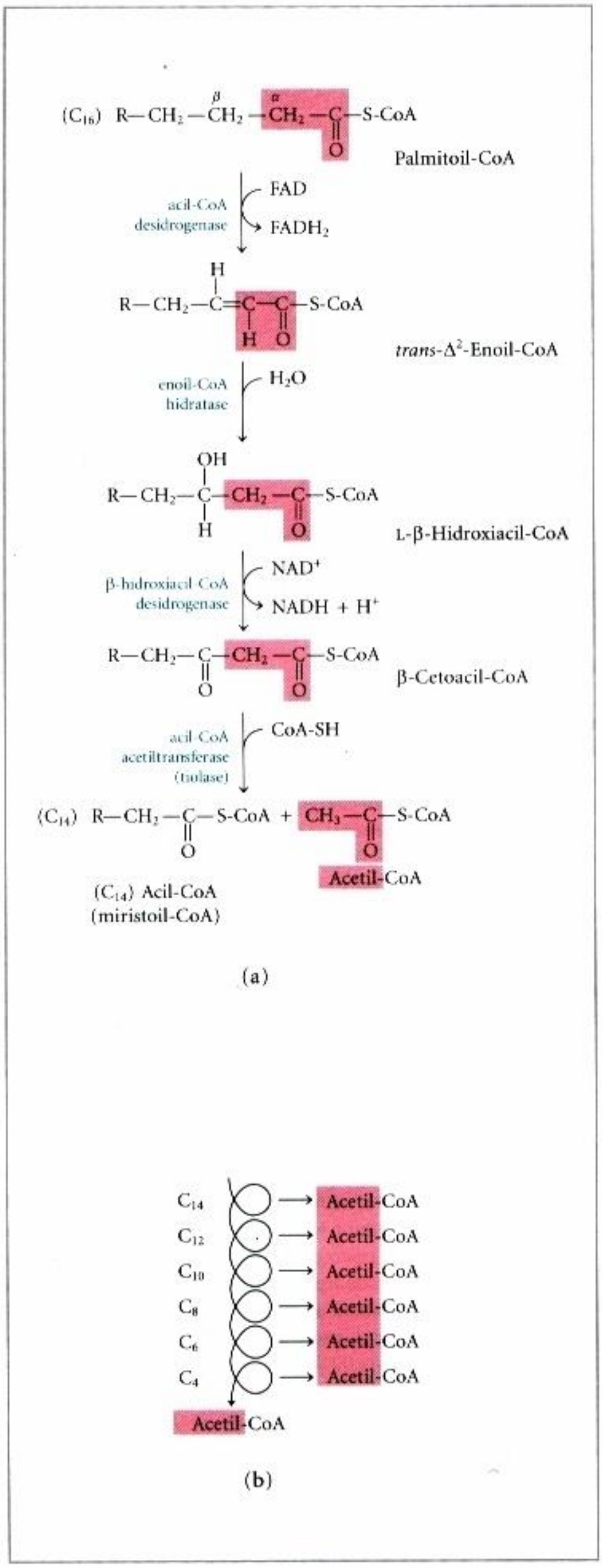

(C16) R—CH2—CH2—CH2—C—S-CoA
β
α
O
Palmitoil-CoA
acil-CoA desidrogenase
FAD
FADH2
R—CH2—C=C—C—S-CoA
H
H O
trans-Δ2-Enoil-CoA
enoil-CoA hidratase
H2O
OH
R—CH2—C—CH2—C—S-CoA
H
O
L-β-Hidroxiacil-CoA
β-hidroxiacil-CoA desidrogenase
NAD+
NADH + H+
R—CH2—C—CH2—C—S-CoA
O
O
β-Cetoacil-CoA
acil-CoA acetiltransferase (tiolase)
CoA-SH
(C14) R—CH2—C—S-CoA + CH3—C—S-CoA
O
O
(C14) Acil-CoA (miristoil-CoA)
Acetil-CoA
(a)
C14
C12
C10
C8
C6
C4
Acetil-CoA
Acetil-CoA
Acetil-CoA
Acetil-CoA
Acetil-CoA
Acetil-CoA
Acetil-CoA
(b)

Figura 17-8 – A via da β-oxidação. (**a**) Em cada um dos passos desta seqüência, um resíduo acetila (sombreado em vermelho) é removido na forma de acetil-CoA da extremidade carboxílica da molécula do ácido graxo, no exemplo o palmitato (C_{16}), que entra na via na forma de palmitoil-CoA. (**b**) Os seis passos seguintes da via liberam mais sete moléculas de acetil-CoA, sendo a sétima originária dos últimos dois átomos da cadeia de 16 carbonos do ácido palmítico. Ao todo são formadas oito moléculas de acetil-CoA.

No terceiro passo, o L-β-hidroxiacil-CoA é desidrogenado para a forma **β-cetoacil-CoA** pela ação da **β-hidroxiacil-CoA desidrogenase**; o NAD^+ é o receptor de elétrons. Essa enzima é absolutamente específica para o estereoisômero L do hidroxiacil-CoA. O NADH formado nessa reação transfere seus elétrons para a **NADH desidrogenase**, um transportador de elétrons da cadeia respiratória; moléculas de ATP são geradas a partir de ADP quando o par de elétrons passa do NADH até O_2, por meio da cadeia respiratória. A reação catalisada pela β-hidroxiacil-CoA desidrogenase é análoga, de forma estreita, à reação da malato desidrogenase do ciclo do ácido cítrico (pág. 450).

O quarto e último passo da oxidação dos ácidos graxos é catalisado pela **acil-CoA acetiltransferase** (mais comumente chamada **tiolase**); ela promove a reação do β-cetoacil-CoA com uma molécula de coenzima A livre para romper o fragmento carboxiterminal de dois átomos de carbono do ácido graxo original na forma de acetil-CoA. O outro produto é o tioéster de coenzima A e do ácido graxo original, agora diminuído de dois átomos de carbono (Fig. 17-8a). Como o β-cetoacil-CoA é rompido por reação do grupo tiol da coenzima A e por analogia com as reações de hidrólise, essa reação é chamada de tiólise.

A ligação simples carbono-carbono que conecta os grupos metileno ($—CH_2—$) nos ácidos graxos é relativamente estável. A seqüência de reações da β-oxidação representa uma solução elegante para o problema de romper essas ligações. As três primeiras reações da β-oxidação têm o efeito de criar uma ligação C—C muito menos estável e, portanto, mais fácil de ser rompida; nela um dos átomos de carbono (o carbono α, C-2) é ligado a *dois* carbonos carbonila. A função cetona no carbono β (C-3) transforma-o em um bom ponto para o ataque nucleofílico pelo —SH da coenzima A, catalisado pela tiolase. A acidez do carbono α faz com que o grupo terminal $—CH_2—CO—S\text{-}CoA$ seja um bom grupo de abandono químico, facilitando o rompimento da ligação α-β.

Os quatro passos são repetidos para produzir acetil-CoA e ATP

Em uma passagem pela seqüência de reações da β-oxidação, uma molécula de acetil-CoA, dois pares de elétrons e quatro prótons (H^+) são removidos do acil-CoA graxo de cadeia longa, diminuindo-o em dois átomos de carbono. A equação para uma passagem, começando com o éster de coenzima A do nosso exemplo, palmitato, é:

$$\text{Palmitoil-CoA} + \text{CoA} + \text{FAD} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{miristoil-CoA} + \text{acetil-CoA} + \text{FADH}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \qquad (17\text{-}2)$$

Em seguida à retirada de um acetil-CoA do palmitoil-CoA, resta o tioéster da coenzima A do ácido graxo diminuído em 2 átomos de carbono, o miristato com 14 átomos de carbono. O miristoil pode, agora, passar por outro conjunto de quatro reações da β-oxidação, de forma análoga ao primeiro, para liberar uma segunda molécula de acetil-CoA e o lauroil-CoA, o tioéster de CoA com o ácido láurico, com 12 átomos de carbono. No final, são necessárias sete passagens pela seqüência de reações da β-oxidação para oxidar uma molécula de palmitoil-CoA em oito moléculas de acetil-CoA (Fig. 17-8b). A equação global é:

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\text{CoA} + 7\text{FAD} + 7\text{NAD}^+ + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7\text{FADH}_2 + 7\text{NADH} + 7\text{H}^+ \qquad (17\text{-}3)$$

Cada molécula de $FADH_2$ formada durante a oxidação de ácidos graxos cede um par de elétrons para o ETF da cadeia respiratória e ao redor de 1,5 molécula de ATP é gerada durante a transferência desse par de elétrons para O_2. Da mesma forma, cada molécula de NADH formada cede um par de elétrons para a NADH desidrogenase mitocondrial, e a transferência subseqüente de cada par de elétrons para O_2 resulta na formação de perto de 2,5 moléculas de ATP. Assim, quatro moléculas de ATP são formadas para cada unidade removida de dois carbonos em uma passagem pela seqüência da β-oxidação. Note que no processo também são produzidas moléculas de água. Transferência de elétrons do NADH ou do $FADH_2$ para o O_2 libera uma molécula de água por par de elétrons. A redução do O_2 pelo NADH também consome um H^+ por molécula de NADH: $NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$. Nos animais que hibernam a oxidação de ácidos graxos fornece energia metabólica, calor e água — todos essenciais para a sobrevivência de um animal que não come e não bebe durante todo o período de hibernação (Adendo 17-1). Os camelos obtêm água pela oxidação dos lipídios armazenados em sua corcova, o que representa um suplemento significativo para as pequenas quantidades disponíveis em seu ambiente natural.

A equação global final para a oxidação do palmitoil-CoA em oito moléculas de acetil-CoA, incluindo as transferências de elétrons e a fosforilação oxidativa, é:

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\text{CoA} + 7O_2 + 28P_i + 28\text{ADP} \longrightarrow 8\text{ acetil-CoA} + 28\text{ATP} + 7H_2O \qquad (17\text{-}4)$$

O acetil-CoA pode ser completamente oxidado por meio da via do ácido cítrico

O acetil-CoA produzido na oxidação dos ácidos graxos pode ser oxidado a CO_2 e H_2O pelo ciclo do ácido cítrico. A equação a seguir representa o balanço final do segundo estágio da oxidação do palmitoil-CoA, que é nosso exemplo, junto com a fosforilação oxidativa do terceiro estágio:

Adendo 17-1

Os ursos obesos realizam a β-oxidação durante seu período de hibernação

Muitos animais dependem da gordura armazenada para obter energia durante seu período de hibernação, durante os períodos migratórios e outras situações que envolvem ajustes metabólicos radicais. Um dos ajustes mais pronunciados do metabolismo lipídico ocorre na hibernação do urso pardo da América do Norte. Esses ursos entram em estado de dormência contínua por períodos tão longos quanto sete meses. De forma diferente de muitas outras espécies hibernantes, os ursos mantêm a sua temperatura corporal entre 32 e 35°C, muito próximo do nível não hibernante normal. Embora o animal nesse estado despenda perto de 25.000kJ/dia (6.000kcal/dia), ele não come, não bebe, não urina ou defeca por meses seguidos.

Um urso pardo prepara o seu ninho de hibernação, perto do Rio McNeil, no Canadá.

Estudos experimentais mostraram que o urso emprega a gordura corporal como seu único combustível durante a hibernação. A oxidação da gordura libera energia suficiente para manter a temperatura corporal, a síntese ativa de aminoácidos e proteínas e outras atividades que necessitam de energia, como o transporte por meio de membranas. A oxidação das gorduras também libera grandes quantidades de água, como descrito no texto, que repõem a água perdida no processo respiratório. A degradação dos triacilgliceróis libera glicerol, o qual é convertido em glicose sangüínea pela neoglicogênese. A uréia formada durante a degradação dos aminoácidos é reabsorvida e reciclada pelo urso, sendo os seus grupos amino reutilizados para a síntese de novos aminoácidos que serão empregados na manutenção das proteínas corporais.

Na sua preparação para os longos períodos de hibernação, o urso armazena uma quantidade enorme de gordura. Normalmente, um urso pardo adulto consome perto de 38.000kJ/dia durante os últimos dias da primavera e todo o verão. Mas, à medida que o inverno se aproxima, os ursos passam a se alimentar durante 20 horas por dia e consomem perto de 84.000kJ/dia. Essa mudança na alimentação ocorre em resposta às alterações sazonais na secreção de hormônios. Grandes quantidades de triacilgliceróis são formadas a partir das grandes quantidades de carboidratos ingeridos durante o período de engorda. Outras espécies hibernantes, incluindo o arganaz (pequeno camundongo silvestre), também acumulam grande quantidade de gordura corporal. O camelo tem grandes quantidades de triacilgliceróis armazenados em sua corcova, uma fonte metabólica de energia e água que o capacita a suportar as difíceis condições do deserto.

$$8 \text{ acetil-CoA} + 16O_2 + 80P_i + 80ADP \longrightarrow 8CoA + 80ATP + 16H_2O + 16CO_2 \qquad (17\text{-}5)$$

Combinando as Equações 17-4 e 17-5, obtemos a equação global final para a oxidação completa do palmitoil-CoA até dióxido de carbono e água:

$$\text{Palmitoil-CoA} + 23O_2 + 108P_i + 108ADP \longrightarrow CoA + 108ATP + 16CO_2 + 23H_2O \qquad (17\text{-}6)$$

A Tabela 17-1 sumariza a produção de NADH, $FADH_2$ e ATP nos passos sucessivos da oxidação dos ácidos graxos. Como a ativação do palmitato em palmitoil-CoA quebra as duas ligações fosfoanidrido do ATP (pág. 468 e Fig. 14-11), o custo energético de ativar um ácido graxo é equivalente a duas moléculas de ATP e o ganho líquido por molécula de palmitato é igual a 106 moléculas de ATP. A variação da energia livre padrão para a oxidação do palmitato até CO_2 + H_2O está próxima de 9.800kJ/mol. Sob condições-padrão, 30,5 × 106 = 3.230kJ/mol (perto de 40% do máximo teórico) são recuperados na forma de ligações fosfato ricas em energia de ATP. Entretanto, quando as variações de energia livre são calculadas, considerando-se as concentrações reais de reagentes e produtos sob as condições intracelulares (veja Adendo 14-2), a recuperação de energia livre está acima de 80%. A conservação de energia é, assim, notavelmente eficiente.

Tabela 17-1 – Rendimento em ATP durante a oxidação de uma molécula de palmitoil-CoA até CO_2 e H_2O

Enzima que catalisa o passo da oxidação	Número de NADH ou $FADH_2$ formados	Número de ATP formados ao final*
Acil-CoA desidrogenase	7 $FADH_2$	10,5
β-Hidroxiacil-CoA desidrogenase	7 NADH	17,5
Isocitrato desidrogenase	8 NADH	20
α-Cetoglutarato desidrogenase	8 NADH	20
Succinil-CoA sintetase		8[†]
Succinato desidrogenase	8 $FADH_2$	12
Malato desidrogenase	8 NADH	20
Total		108

*Nestes cálculos, considera-se que a fosforilação oxidativa mitocondrial produz 1,5 ATP por $FADH_2$ oxidado e 2,5 ATP por NADH oxidado.

[†] O GTP produzido diretamente neste passo libera ATP na reação catalisada pela nucleosídeo difosfato quinase (pág. 449).

A oxidação dos ácidos graxos insaturados requer duas reações adicionais

A seqüência de oxidação dos ácidos graxos que acabamos de descrever é típica quando o ácido graxo que passa por essa seqüência de reações é saturado (isto é, tem apenas ligações simples em sua cadeia carbônica). Entretanto, a maioria dos ácidos graxos nos triacilgliceróis e nos fosfolipídios de animais e vegetais são insaturados, possuindo uma ou mais duplas ligações. Essas ligações estão na configuração *cis* e não podem sofrer a ação da enoil-CoA hidratase, a enzima que catalisa a adição de H_2O na dupla ligação *trans* do Δ^2-enoil-CoA gerado durante a β-oxidação. Entretanto, por meio da ação de duas enzimas auxiliares, a oxidação dos ácidos graxos pela seqüência descrita anteriormente pode também quebrar os ácidos graxos insaturados comuns. A atuação dessas duas enzimas, sendo a primeira uma isomerase e a outra uma redutase, será ilustrada por dois exemplos.

Vamos seguir a oxidação do oleato, um ácido graxo abundante, com 18 átomos de carbono na cadeia, monoinsaturado e com uma dupla ligação *cis* entre C-9 e C-10 (denotada Δ^9). O oleato é convertido em oleoil-CoA (Fig. 17-9), transportado através da membrana mitocondrial como oleoil-carnitina e, então, convertido novamente em oleoil-CoA na matriz da mitocôndria (Fig. 17-6). O oleoil-CoA passa então por três passos do ciclo de oxidação dos ácidos graxos e libera três moléculas de acetil-CoA, além do éster de coenzima A de um ácido graxo insaturado de 12 átomos de carbono Δ^3, o *cis*-Δ^3-dodecenoil-CoA (Fig. 17-9). Esse produto não pode sofrer a ação da próxima enzima na via de β-oxidação, a enoil-CoA hidratase, pois esta age apenas em duplas ligações do tipo *trans*. Entretanto, pela ação da enzima auxiliar, **enoil-CoA isomerase**, o *cis*-Δ^3-enoil-CoA é isomerizado para liberar o *trans*-Δ^2-enoil-CoA, que é convertido pela enoil-CoA hidratase no correspondente L-β-hidroxiacil-CoA (*trans*-Δ^2-dodecenoil-CoA). Esse intermediário sofre agora a ação das enzimas remanescentes da β-oxidação para liberar acetil-CoA e um ácido graxo saturado de 10 carbonos como o seu éster de coenzima A (decanoil-CoA). O último sofre quatro outros passos por meio da via para liberar um total de nove moléculas de acetil-CoA, resultante de uma molécula de oleato com 18 átomos de carbono.

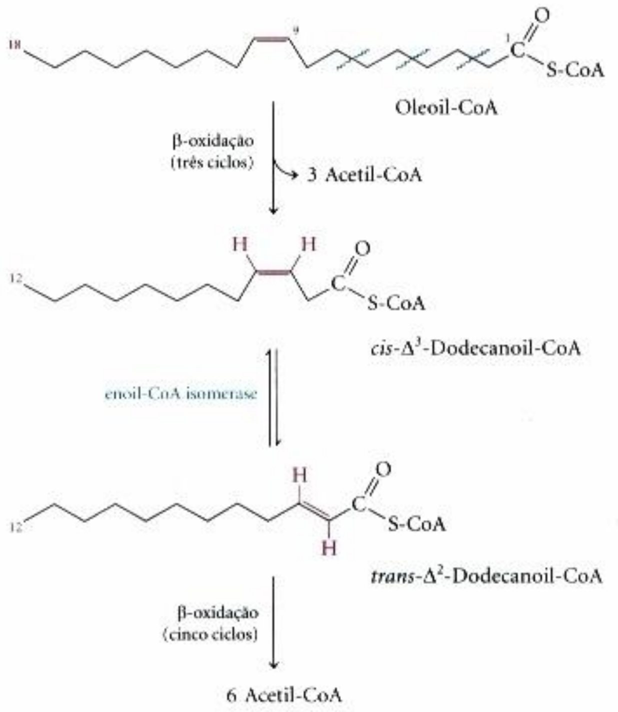


Figura 17-9 – A oxidação de um acil-CoA graxo monoinsaturado. O ácido oléico, como oleil-CoA (Δ^9), é o exemplo aqui empregado. Sua oxidação exige uma enzima adicional, a enoil-CoA isomerase; essa enzima reposiciona a dupla ligação, convertendo o isômero *cis* em isômero *trans*, um intermediário normal da β-oxidação.

A outra enzima auxiliar (uma redutase) é requerida pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. Como exemplo, vamos tomar o linoleato com 18 carbonos, que possui uma configuração *cis*-Δ^9,*cis*-Δ^{12} (Fig. 17-10). O linoleoil-CoA sofre três passos por meio da seqüência-padrão de β-oxidação para liberar três moléculas de acetil-CoA e um éster de coenzima A de um ácido graxo insaturado com 12 carbonos e uma configuração *cis*-Δ^3,*cis*-Δ^6. Esse intermediário não pode ser empregado pelas enzimas da via de β-oxidação; as suas duplas ligações estão em posições erradas e possuem a configuração errada (*cis*, e não *trans*). Entretanto, a ação combinada da enoil-CoA isomerase e da **2,4-dienoil-CoA redutase** (Fig. 17-10) permite a reentrada desse intermediário na via normal de β-oxidação e a sua degradação em seis moléculas de acetil-CoA. O resultado global é a conversão do linoleato em nove moléculas de acetil-CoA.

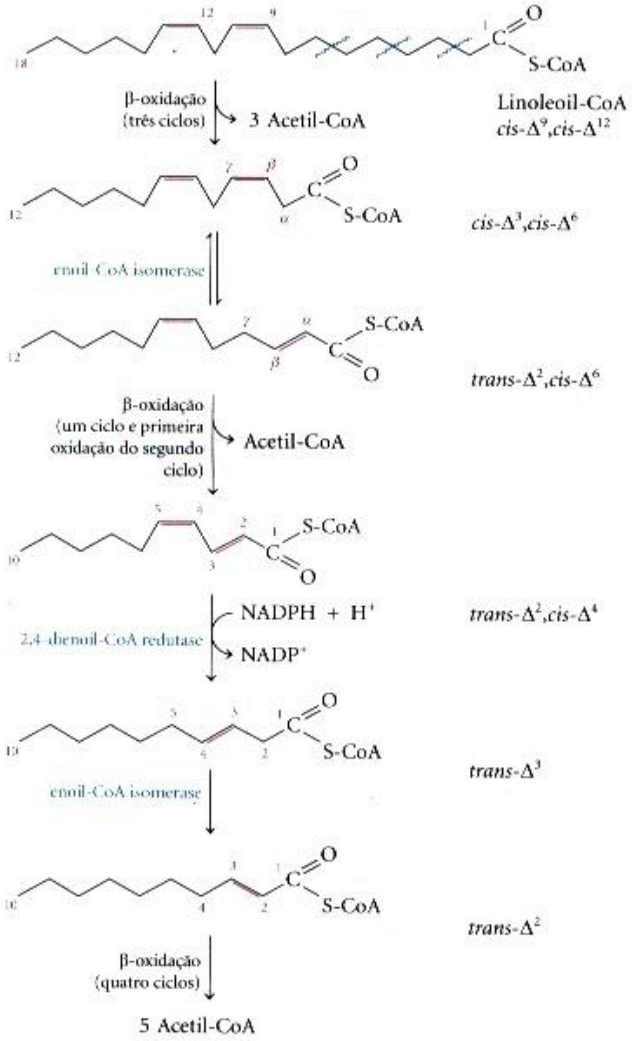

18
12
9
1
S-CoA
β-oxidação (três ciclos)
3 Acetil-CoA
Linoleoil-CoA
cis-Δ^9,cis-Δ^{12}
12
γ
β
α
S-CoA
cis-Δ^3,cis-Δ^6
enoil-CoA isomerase
S-CoA
trans-Δ^2,cis-Δ^6
β-oxidação (um ciclo e primeira oxidação do segundo ciclo)
Acetil-CoA
10
5
4
2
1
3
S-CoA
NADPH + H⁺
NADP⁺
2,4-dienoil-CoA redutase
trans-Δ^2,cis-Δ^4
S-CoA
trans-Δ^3
enoil-CoA isomerase
S-CoA
trans-Δ^2
β-oxidação (quatro ciclos)
5 Acetil-CoA

Figura 17-10 – Oxidação de um ácido graxo poliinsaturado. O exemplo apresentado é o ácido linoléico em sua forma ativada linoleil-CoA ($\Delta^{9,12}$). Além da enoil-CoA isomerase, essa oxidação requer uma segunda enzima auxiliar: a 2,4-dienoil-CoA redutase dependente de NADPH. A ação combinada dessas duas enzimas converte a *trans*-Δ^2,*cis*-Δ^4-dienoil-CoA intermediária no substrato *trans*-Δ^2-enoil-CoA necessário para a β-oxidação.

A oxidação completa de ácidos graxos de número ímpar requer três reações extras

Embora o maior número de lipídios de ocorrência natural contenha ácidos graxos com um número par de átomos de carbono, os ácidos graxos com um número ímpar de carbonos são encontrados em quantidades significativas nos lipídios de muitos vegetais e de organismos marinhos. Pequenas quantidades de propionato, com três átomos de carbono, são adicionadas a pães e cereais como inibidoras de crescimento de fungos, portanto o propionato entra na dieta humana. Além disso, o gado e outros animais ruminantes formam grandes quantidades de propionato durante a fermentação dos carboidratos no rúmen. O propionato assim formado é absorvido no sangue e oxidado pelo fígado e em outros tecidos.

$$CH_3{-}CH_2{-}COO^-$$

Propionato

Ácidos graxos de cadeia longa e número ímpar de átomos de carbono são oxidados pela mesma via dos ácidos com número par de átomos de carbono, começando sempre na extremidade da cadeia que contém a carboxila. Entretanto, o substrato para o último passo por meio da seqüência de β-oxidação é um acil-CoA graxo que tem cinco átomos de carbono. Quando esse ácido é clivado mais uma vez, os produtos são acetil-CoA e **propionil-CoA.** O acetil-CoA é oxidado pela via do ácido cítrico, mas o propionil-CoA toma uma via enzimática incomum, envolvendo três enzimas.

O propionil-CoA é primeiro carboxilado para formar o estereoisômero D do **metilmalonil-CoA** (Fig. 17-11) pela **propionil-CoA carboxilase**, que contém o co-fator biotina. Nessa reação enzimática, como naquela da reação da piruvato carboxilase (veja Fig. 16-14), o CO_2 (ou sua forma hidratada, o íon HCO_3^-) é ativado pela ligação à biotina, antes de sua transferência para o propionato. A formação do intermediário carboxibiotina requer energia, e esta é fornecida pela clivagem do ATP até AMP e PP_i. O D-metilmalonil-CoA assim formado é enzimaticamente epimerizado, formando seu estereoisômero L pela ação da **metilmalonil-CoA epimerase** (Fig. 17-11). O L-metilmalonil-CoA sofre então um rearranjo intramolecular e forma o succinil-CoA, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico. Esse rearranjo é catalisado pela **metilmalonil-CoA mutase**, que requer como coenzima a **desoxiadenosilcobalamina**, ou **coenzima B_{12}**, derivada da vitamina B_{12} (cobalamina). O Adendo 17-2 descreve o papel da coenzima B_{12} nessa notável reação de troca.

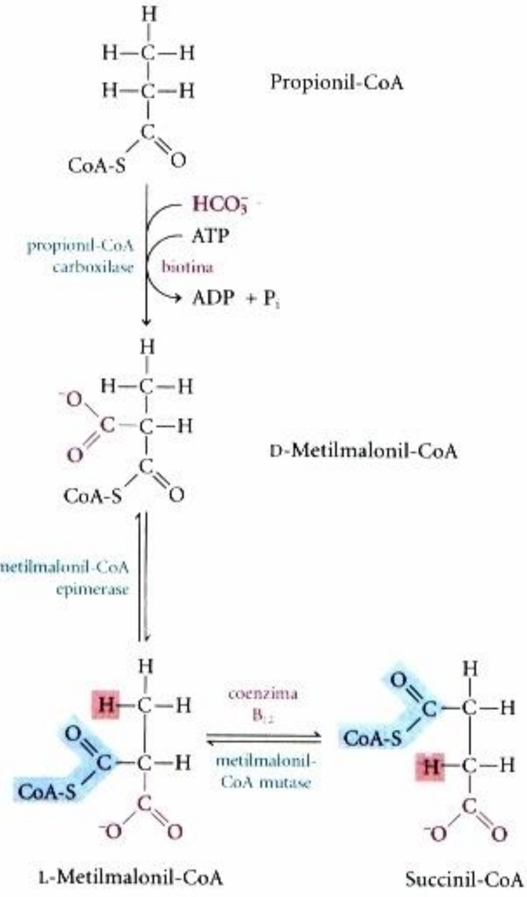

Propionil-CoA
CoA-S
HCO_3^-
ATP
propionil-CoA carboxilase
biotina
ADP + P_i
D-Metilmalonil-CoA
metilmalonil-CoA epimerase
coenzima B_{12}
metilmalonil-CoA mutase
L-Metilmalonil-CoA
Succinil-CoA

Figura 17-11 – A oxidação do propionil-CoA produzido pela β-oxidação de ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono. A seqüência envolve carboxilação do propionil-CoA e formação do D-metilmalonil-CoA e a conversão deste último em succinil-CoA. Essa conversão requer a epimerização da forma D para a forma L-metilmalonil-CoA seguida de uma reação notável; nela, os substituintes nos átomos de carbono adjacentes trocam de posição entre si (veja Adendo 17-2).

Adendo 17-2 Coenzima B_{12}: Uma solução radical para um problema desconcertante

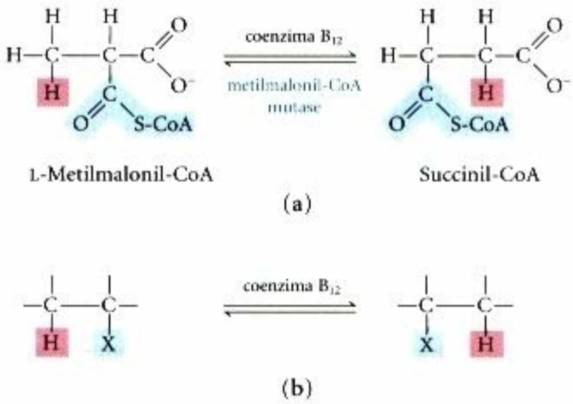


Figura 1

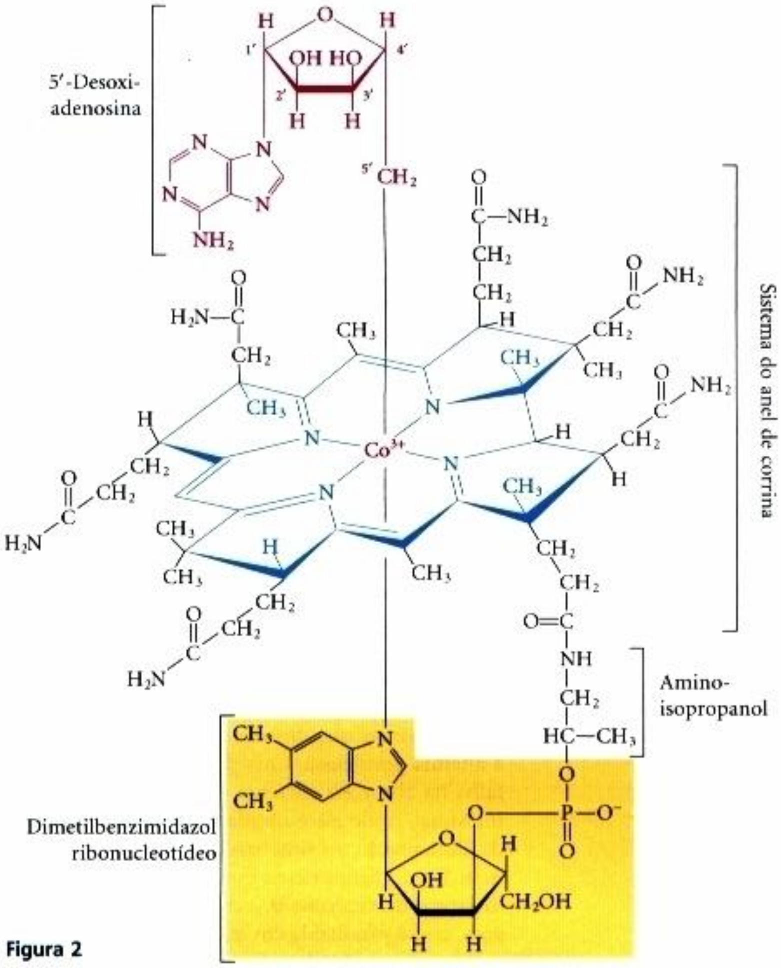

5′-Desoxi-adenosina
Sistema do anel de corrina
Amino-isopropanol
Dimetilbenzimidazol ribonucleotídeo
Co^{3+}

Figura 2

Na reação catalisada pela metilmalonil-CoA mutase (veja Fig. 17-11), o grupo —CO—S-CoA, situado em C-2 do propionato original, troca de posição com um átomo de hidrogênio em C-3 do propionato original (Fig. 1a). A coenzima B_{12} é o co-fator para essa reação, como também para quase todas as outras enzimas que catalisam reações desse mesmo tipo geral (Fig. 1b). Essas reações dependentes da coenzima B_{12} estão entre as pouco numerosas reações enzimáticas nas quais ocorre a troca de um grupo alquila, ou grupo alquila substituído (X), por um átomo de hidrogênio situado em um carbono adjacente, *sem que ocorra qualquer mistura do átomo de hidrogênio transferido com o hidrogênio do solvente*, H_2O. Como é possível para o átomo de hidrogênio mover-se de um para outro átomo de carbono sem se misturar com o enorme excesso de átomos de hidrogênio do solvente?

A coenzima B_{12} é a forma de co-fator da vitamina B_{12}, a qual é única entre todas as vitaminas pelo fato de ela conter não apenas uma molécula orgânica complexa, mas também um microelemento essencial, o cobalto. Um átomo desse elemento (como Co^{3+}) está coordenado com o complexo **sistema em anel de corrina** da vitamina B_{12} (colorido em azul na Fig. 2); esse anel é quimicamente relacionado ao sistema em anel da porfirina do grupo heme e das heme-proteínas (veja Fig. 7-1). Uma quinta posição de coordenação do cobalto é preenchida por um nucleotídeo, o dimetilbenzimidazol ribonucleotídeo (em amarelo), ligado covalentemente por seu grupo 3′-fosfato a uma das cadeias laterais do anel de corrina por meio do aminoisopropanol.

A vitamina B_{12} na forma em que é geralmente isolada é chamada de **cianocobalamina**, porque ela contém um grupo ciano (capturado durante a purificação) ligado ao cobalto na sexta posição de coordenação. Na **5′-desoxiadenosilcobalamina**, o co-fator para a metilmalonil-CoA mutase, o grupo ciano é substituído pelo grupo **5′-desoxiadenosil** (em vermelho na Fig. 2), ligado covalentemente por meio de C-5′ ao átomo de cobalto. A estrutura tridimensional desse co-fator foi determinada por técnicas de cristalografia de raios X por Dorothy Crowfoot Hodgkin, em 1956.

A formação desse co-fator complexo (Fig. 3) é um dos dois únicos casos conhecidos nos quais todos os fosfatos do ATP são clivados; o outro caso é a formação da *S*-adenosilmetionina a partir de ATP e metionina (veja Fig. 18-17).

Dorothy Crowfoot Hodgkin (1910-1994)

Continua na página seguinte.

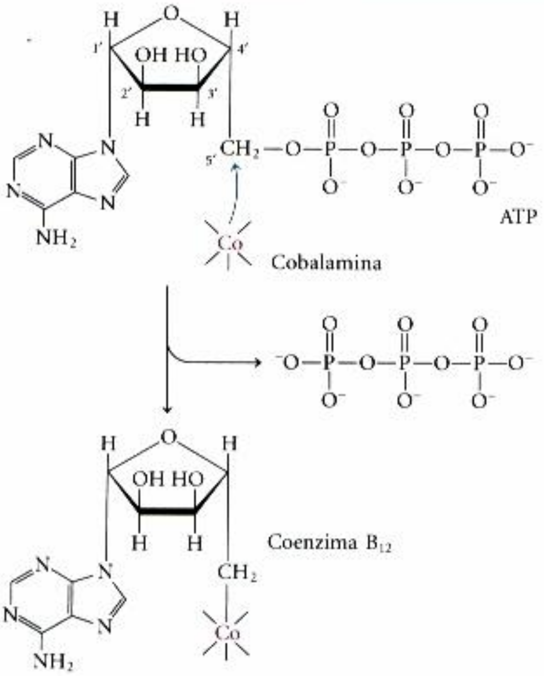


Figura 3

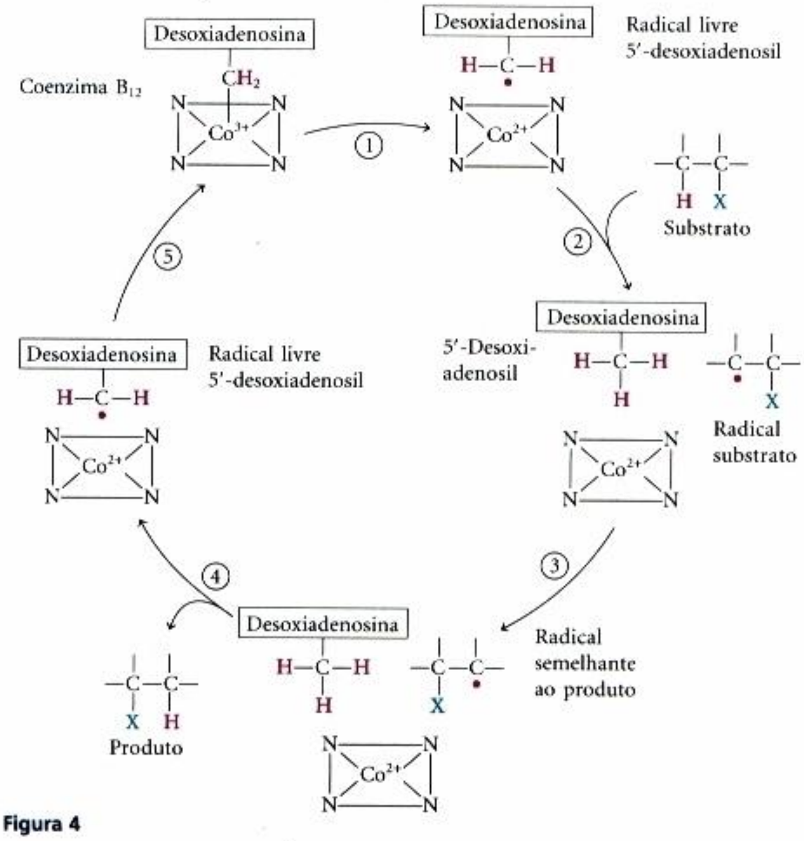


Figura 4

A chave para entendermos como a coenzima B_{12} catalisa a troca de posição do hidrogênio está nas propriedades da ligação covalente entre o cobalto e o C-5′ do grupo desoxiadenosil (Fig. 2). Essa é uma relação relativamente fraca; a sua energia de dissociação é mais ou menos 110kJ/mol, comparada com 348kJ/mol para uma ligação C—C típica ou 414kJ/mol para uma ligação C—H. Essa ponte é tão fraca que pode ser rompida pela simples iluminação do composto com luz visível (essa extrema fotolabilidade provavelmente é responsável pelo fato de as plantas não conterem vitamina B_{12}). A dissociação produz o radical 5′-desoxiadenosil e a forma Co^{2+} da vitamina. Gerar radicais livres dessa forma é a função química da 5′-desoxiadenosilcobalamina, dando início a uma série de transformações como as que estão ilustradas na Figura 4, um mecanismo proposto para a reação catalisada pela metilmalonil-CoA mutase, para um certo número de outras transformações dependentes da coenzima B_{12}.

Primeiro, a enzima rompe a ligação Co—C no co-fator, deixando a coenzima em sua forma Co^{2+} e produzindo o radical livre 5′-desoxiadenosil (passo ①). Esse radical agora retira um átomo de hidrogênio do substrato, convertendo-o em um radical e produzindo 5′-desoxiadenosina (passo ②). O rearranjo do radical substrato produz outro radical (passo ③); nele o grupo migrante X (—CO—S-CoA para a metilmalonil-CoA mutase) moveu-se para o carbono adjacente para formar um radical semelhante ao produto. O átomo de hidrogênio inicialmente retirado do substrato é agora parte do grupo —CH_3 da 5′-desoxiadenosina; um dos hidrogênios desse mesmo grupo —CH_3 (ele pode ser o mesmo que foi originalmente retirado) retorna para o radical semelhante ao produto, gerando o produto e regenerando o radical livre desoxiadenosil (passo ④). Finalmente, a ponte entre o cobalto e o grupo —$\dot{C}H_2$ do radical desoxiadenosil é refeita (passo ⑤), destruindo o radical livre e regenerando o co-fator na sua forma Co^{3+}, pronto para participar de outro ciclo catalítico.

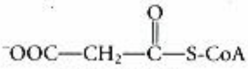
Nesse mecanismo proposto, o átomo de hidrogênio migrante nunca existe como espécie livre e, portanto, nunca está livre para ser trocado com os hidrogênios das moléculas de água que constituem o solvente.

A deficiência de vitamina B_{12} resulta em uma doença muito grave. A vitamina B_{12} não é fabricada por plantas ou animais e pode ser sintetizada apenas por reduzido número de espécies de microrganismos. Para as pessoas sadias, ela é necessária em pequeníssimas quantidades, perto de 3μg/dia, mas a **anemia perniciosa,** uma doença grave, resulta da falha na absorção eficiente da vitamina B_{12} da luz intestinal, onde ela é obtida por digestão da carne da alimentação ou sintetizada por bactérias intestinais. Uma glicoproteína essencial para a absorção intestinal da vitamina B_{12}, chamada de **fator intrínseco,** não é produzida em quantidade suficiente em pessoas com essa doença. A patologia da anemia perniciosa inclui uma reduzida produção de eritrócitos, níveis reduzidos de hemoglobina e deficiências severas e progressivas do sistema nervoso central. Ao menos em alguns casos, a administração de grandes doses de vitamina B_{12} alivia esses sinais.

A oxidação dos ácidos graxos é regulada de maneira estrita

A oxidação dos ácidos graxos consome um combustível precioso, assim, ela é regulada de forma que ocorra apenas quando a necessidade por energia requer. No fígado, o acil-CoA graxo formado no citosol tem duas grandes vias abertas para si: (1) a β-oxidação pelas enzimas da mitocôndria ou (2) a conversão em triacilgliceróis e fosfolipídios pelas enzimas do citosol. A velocidade de transferência para o interior das mitocôndrias dos acil-CoA graxos de cadeia longa decide qual via será tomada. O processo em três passos, por meio do qual os grupos acil-graxos são transferidos do citosol para a matriz mitocondrial (veja Fig. 17-6), é o limitante da velocidade de oxidação dos ácidos graxos. Uma vez que os grupos acil-graxos entram na mitocôndria, eles estão definitivamente destinados à oxidação até acetil-CoA.

A concentração do **malonil-CoA**, o primeiro intermediário na biossíntese citosólica dos ácidos graxos de cadeia longa a partir do acetil-CoA, aumenta sempre que o animal é bem suprido com carboidratos; qualquer excesso de glicose que não possa ser oxidado ou armazenado como glicogênio é convertido em ácidos graxos citosólicos para estocagem, na forma de triacilglicerol. A inibição da carnitina aciltransferase I pelo malonil-CoA assegura que a oxidação dos ácidos graxos seja diminuída sempre que o fígado tenha amplo suprimento de glicose para usar como combustível e, ao mesmo tempo, esteja fabricando ativamente triacilgliceróis a partir dessa glicose em excesso.



$^{-}OOC{-}CH_2{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}S\text{-}CoA$

Malonil-CoA

Duas das enzimas da β-oxidação também são reguladas por metabólitos que sinalizam o suprimento suficiente de energia. Quando a relação $[NADH]/[NAD^+]$ está alta, a hidroxiacil-CoA desidrogenase é inibida; além disso, altas concentrações de acetil-CoA inibem a tiolase.

A β-oxidação também ocorre nos peroxissomos

Embora nas células animais o principal sítio de oxidação dos ácidos graxos seja a matriz mitocondrial, outros compartimentos em determinadas células também contêm enzimas capazes de oxidar os ácidos graxos até acetil-CoA, por uma via similar, embora não idêntica, àquela existente na mitocôndria. Os peroxissomos são compartimentos celulares enclausurados por membranas (veja pág. 26) existentes em animais e plantas; neles, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido por oxidação dos ácidos graxos e, imediatamente a seguir, destruído enzimaticamente. Como na oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria, os intermediários são derivados da coenzima A, e o processo consiste de quatro passos (Fig. 17-12): (1) desidrogenação; (2) adição de água à dupla ligação formada; (3) oxidação do β-hidroxiacil-CoA a uma cetona, e (4) clivagem tiolítica por meio da coenzima A (Como discutido adiante, reações idênticas também ocorrem nos glioxissomos). A diferença entre as vias existentes na mitocôndria e no peroxissomo está no primeiro passo. Nos peroxissomos, a flavoproteína desidrogenase que introduz a dupla ligação passa seus elétrons diretamente para O_2, produzindo H_2O_2 (Fig. 17-12). A água oxigenada é um oxidante forte e potencialmente perigoso e, assim, é imediatamente decomposta em H_2O e O_2 pela enzima **catalase**. Em contraste, na mitocôndria, os elétrons removidos no primeiro passo de oxidação pas-

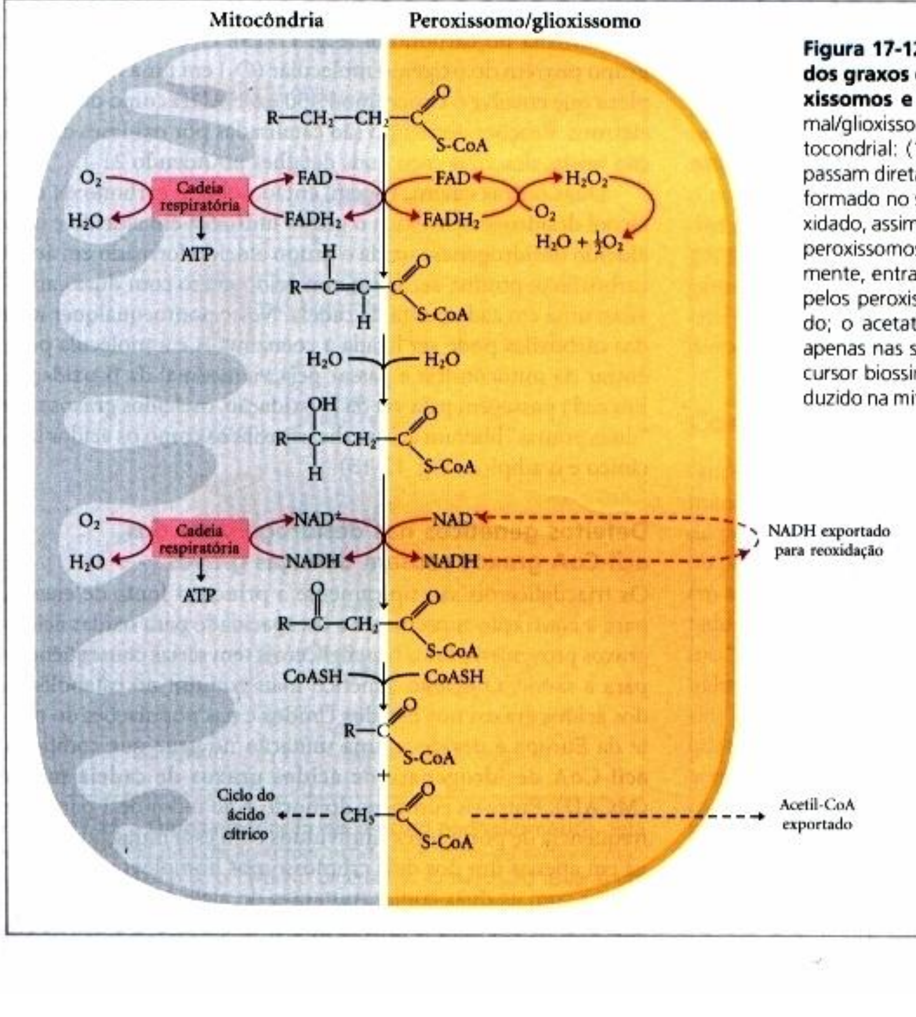


Figura 17-12 – Comparação da β-oxidação dos ácidos graxos que ocorre nas mitocôndrias, nos peroxissomos e nos glioxissomos. O sistema peroxissomal/glioxissomal difere em dois aspectos do sistema mitocondrial: (1) no primeiro passo oxidativo os elétrons passam diretamente para O_2, gerando H_2O_2; (2) o NADH formado no segundo passo oxidativo não pode ser reoxidado, assim, equivalentes redutores são exportados dos peroxissomos e dos glioxissomos para o citosol e, finalmente, entram na mitocôndria. O acetil-CoA produzido pelos peroxissomos e glioxissomos também é exportado; o acetato dos glioxissomos (organela encontrada apenas nas sementes em germinação) serve como precursor biossintético (veja Fig. 17-13). O acetil-CoA produzido na mitocôndria é oxidado no ciclo do ácido cítrico.

sam por meio da cadeia respiratória até O_2, e H_2O é o produto final, um processo acompanhado pela síntese de ATP. Nos peroxissomos, a energia liberada no primeiro passo oxidativo da quebra dos ácidos graxos é dissipada como calor.

Grandes quantidades de gorduras na dieta de um mamífero resultam em aumento da síntese das enzimas responsáveis pela β-oxidação peroxissomal no fígado. Os peroxissomos hepáticos não contêm as enzimas do ciclo do ácido cítrico e não podem catalisar a oxidação do acetil-CoA em CO_2. Em vez disso, o acetato produzido pela oxidação dos ácidos graxos é exportado dos peroxissomos, presumivelmente parte desse acetato entra na mitocôndria e é aí oxidado.

Os peroxissomos e os glioxissomos vegetais empregam o acetil-CoA produzido na β-oxidação como um precursor biossintético

Nos vegetais, a oxidação dos ácidos graxos ocorre nos peroxissomos do tecido das folhas e nos glioxissomos das sementes em germinação. Os peroxissomos e os glioxissomos vegetais são similares em estrutura e função. Os glioxissomos ocorrem apenas durante a germinação das sementes e podem ser considerados como peroxissomos especializados.

Nas plantas, o papel biológico da β-oxidação que ocorre nos peroxissomos e glioxissomos é fornecer precursores biossintéticos que se originam de lipídios armazenados. A via da β-oxidação não é uma fonte importante de energia metabólica nos vegetais; de fato, as mitocôndrias das plantas não contêm as enzimas da β-oxidação. Durante a germinação, os triacilgliceróis armazenados nas sementes são convertidos em glicose, sacarose e em uma grande variedade de outros metabólitos essenciais (Fig. 17-13). Os ácidos graxos liberados dos triacilgliceróis são ativados por transformação em seus derivados de coenzima A e oxidados nos glioxissomos, por meio do mesmo processo de quatro passos que ocorre nos peroxissomos (Fig. 17-12). O acetil-CoA produzido é convertido pelo ciclo do glioxalato (veja Fig. 16-16) em precursores de quatro átomos de carbono da gliconeogênese (veja Fig. 20-2). Os glioxissomos, como os peroxissomos, contêm altas concentrações de catalase, a qual converte H_2O_2 produzido pela β-oxidação em H_2O e O_2.

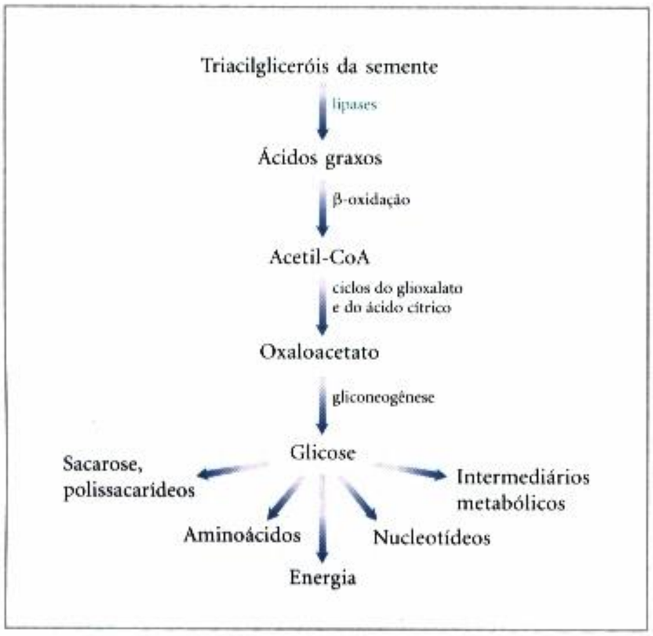

Triacilgliceróis da semente
lipases
Ácidos graxos
β-oxidação
Acetil-CoA
ciclos do glioxalato e do ácido cítrico
Oxaloacetato
gliconeogênese
Glicose
Sacarose, polissacarídeos
Intermediários metabólicos
Aminoácidos
Nucleotídeos
Energia

Figura 17-13 – O papel da β-oxidação na conversão de triacilgliceróis de reserva em glicose, como ocorre nas sementes em germinação.

As enzimas da β-oxidação nas diferentes organelas divergiram durante a evolução biológica

Embora a seqüência de reações da β-oxidação na mitocôndria seja essencialmente a mesma que existe nos peroxissomos e nos glioxissomos, as enzimas mitocondriais diferem significativamente das suas isoenzimas naqueles compartimentos. Aparentemente, essas diferenças refletem a divergência que ocorreu muito cedo na evolução, quando da separação das bactérias gram-positivas das gram-negativas (veja Fig. 2-5). Nas mitocôndrias, cada uma das quatro enzimas da β-oxidação é uma proteína solúvel e separada, similar em estrutura às enzimas análogas existentes nas bactérias gram-positivas. Entretanto, as enzimas dos peroxissomos e glioxissomos são parte de um complexo de proteínas e pelo menos uma delas contém duas atividades enzimáticas em uma única cadeia polipeptídica (Fig. 17-14). Assim, as atividades enzimáticas de enoil-CoA hidratase e a L-β-hidroxiacil-CoA desidrogenase residem em uma única proteína monomérica (M_r ~150.000), valor próximo da proteína funcional similar da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. Ainda não está claro o valor seletivo evolucionário de reter ambos os tipos de sistemas de β-oxidação no mesmo organismo.

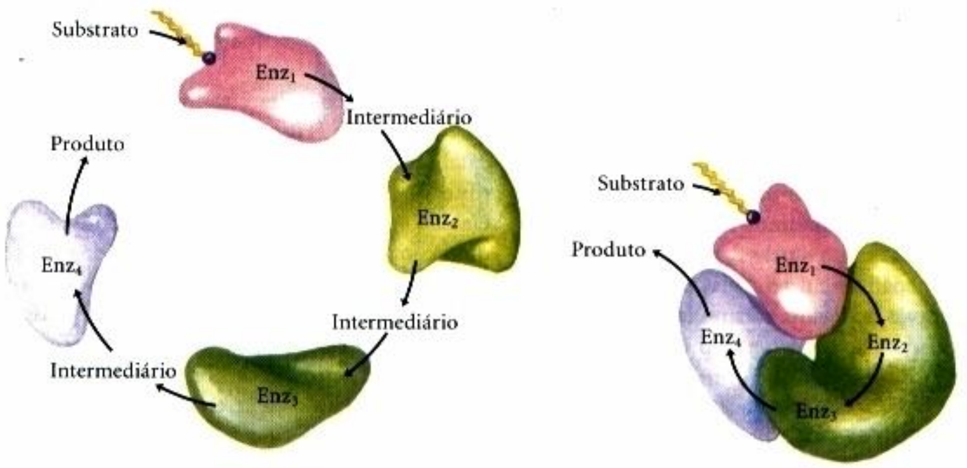
A ômega oxidação ocorre no retículo endoplasmático

Embora a β-oxidação, na qual as enzimas agem na ponta carboxílica de um ácido graxo, seja de longe o destino catabólico mais importante dos ácidos graxos, existe uma outra via, em alguns organismos, vertebrados inclusos, que envolve a oxidação do carbono ômega (ω) ou o átomo de carbono mais distante do grupo carboxila. As enzimas características dessa via se encontram (nos vertebrados) no retículo endoplasmático do fígado e do rim, e os substratos preferidos são ácidos graxos com 10 a 12 átomos de carbono. O primeiro passo da via introduz um grupo hidroxila no carbono ω (Fig. 17-15). O oxigênio para esse grupo provém do oxigênio molecular (O_2) em uma reação complexa que envolve o citocromo P450 e o NADH como doador de elétrons. Reações desse tipo são catalisadas por **oxidases de função mista**, descritas com mais detalhes no Adendo 21-1.

Duas outras enzimas agem, então, sobre o carbono ω: uma **álcool desidrogenase** oxida o grupo hidroxila em aldeído e uma **aldeído desidrogenase** oxida o grupo aldeído formado em ácido carboxílico; produz-se, assim, um ácido graxo com duas carboxilas: uma em cada ponta da cadeia. Nesse ponto, qualquer uma das carboxilas pode ser ligada à coenzima A e a molécula pode entrar na mitocôndria e passar pela via normal da β-oxidação. Em cada passagem pela via da β-oxidação, os ácidos graxos com "duas pontas" liberam ácidos dicarboxílicos como os ácidos succínico e o adípico (Fig. 17-15).

Defeitos genéticos nas desidrogenases dos acil-CoA graxos causam doenças graves

Os triacilgliceróis são tipicamente a principal fonte de energia para a contração muscular, e a incapacidade para oxidar ácidos graxos provenientes dos triacilgliceróis tem sérias conseqüências para a saúde. O defeito genético mais comum no catabolismo dos ácidos graxos nos Estados Unidos e nas populações do norte da Europa é devido a uma mutação no gene que codifica a **acil-CoA desidrogenase de ácidos graxos de cadeia média (MCAD)**. Entre os europeus do norte, é ao redor de 1 para 40 a freqüência de portadores (indivíduos com essa mutação recessiva em apenas um dos dois cromossomos homólogos). Os indivíduos com as duas cópias mutantes do alelo MCAD são incapazes de oxidar ácidos graxos de 6 a 12 carbonos. Eles exibem


Substrato
Enz₁
Intermediário
Enz₂
Intermediário
Enz₃
Intermediário
Enz₄
Produto
Substrato
Produto
Enz₁
Enz₂
Enz₃
Enz₄

Bactérias gram-positivas

Bactérias gram-negativas

Figura 17-14 – Comparação das enzimas da β-oxidação nas bactérias gram-positivas e nas gram-negativas. As quatro enzimas da β-oxidação nas bactérias gram-positivas são entidades separadas, como aquelas da mitocôndria. O complexo de quatro atividades enzimáticas (duas das quais são parte de uma única cadeia polipeptídica) típico das bactérias gram-negativas também é encontrado nos sistemas de β-oxidação dos peroxissomos e glioxissomos. Enz_1 = acil-CoA desidrogenase; Enz_2 = enoil-CoA hidratase; Enz_3 = L-β-hidroxiacil-CoA desidrogenase; Enz_4 = tiolase.

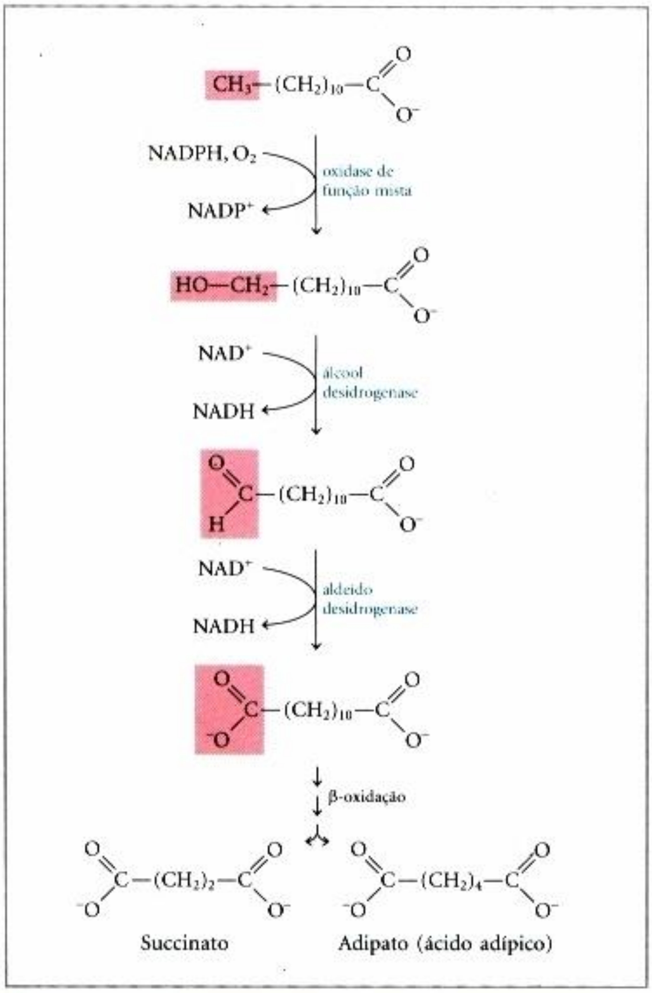
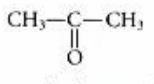

CH₃—(CH₂)₁₀—C(=O)O⁻
NADPH, O₂
NADP⁺
oxidase de função mista
HO—CH₂—(CH₂)₁₀—C(=O)O⁻
NAD⁺
NADH
álcool desidrogenase
H(O=)C—(CH₂)₁₀—C(=O)O⁻
NAD⁺
NADH
aldeído desidrogenase
⁻O(O=)C—(CH₂)₁₀—C(=O)O⁻
β-oxidação
⁻O(O=)C—(CH₂)₂—C(=O)O⁻
⁻O(O=)C—(CH₂)₄—C(=O)O⁻
Succinato
Adipato (ácido adípico)

Figura 17-15 – Ômega-oxidação no retículo endoplasmático. Esta via alternativa da β-oxidação começa com a oxidação do carbono mais distante do carbono α, o carbono ômega (ω). O substrato usual é um ácido graxo de cadeia de tamanho médio. Essa via não é, em geral, a maior via para o catabolismo oxidativo dos ácidos graxos.

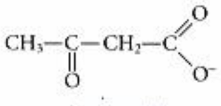
episódios recorrentes de uma síndrome que inclui acúmulo gorduroso no fígado, altos níveis de ácido octanóico no sangue, baixa concentração de glicose no sangue (hipoglicemia), sonolência, vômitos e coma. O padrão de ácidos orgânicos na urina ajuda no diagnóstico dessa doença. A urina tem, comumente, altos níveis de ácidos dicarboxílicos com 6 a 10 átomos de carbono (produzidos por ω-oxidação), mas os altos níveis de corpos cetônicos urinários (veja a seguir) associados, em geral, com quadros hipoglicêmicos não estão presentes. Embora os pacientes possam não exibir nenhum sintoma entre os episódios, estes são muito sérios. A mortalidade dessa doença varia de 25% a 60% na primeira infância. Se o defeito genético é detectado logo após o nascimento, o indivíduo afetado pode passar a receber uma dieta pobre em lipídios e rica em carboidratos. Intervalos longos entre as refeições devem ser evitados para impedir que o organismo passe a consumir suas reservas lipídicas como fonte de energia. Com a detecção precoce e gerenciamento cuidadoso da dieta, o prognóstico para esses pacientes é muito bom.

Corpos Cetônicos

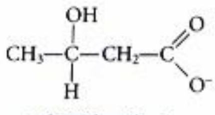
Durante a oxidação dos ácidos graxos no fígado dos seres humanos e da maioria dos outros mamíferos, o acetil-CoA formado pode entrar no ciclo do ácido cítrico (Estágio 2 da Fig. 17-7) ou pode ser convertido nos chamados "corpos cetônicos", ou seja, em **acetona**, **acetoacetato** e **D-β-hidroxibutirato**, que são exportados para outros tecidos através da circulação sangüínea (o termo "corpos" é um artefato histórico; o termo é aplicado ocasionalmente a partículas insolúveis, mas esses compostos são solúveis no sangue e na urina). A acetona, produzida em menores quantidades que os outros corpos cetônicos, é exalada. O acetoacetato e o D-β-hidroxibutirato são transportados pelo sangue


$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3$

Acetona


$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_2-C(=O)O^-$

Acetoacetato


$CH_3-\overset{\overset{OH}{|}}{\underset{\underset{H}{|}}{C}}-CH_2-C(=O)O^-$

D-β-Hidroxibutirato

para os tecidos que não o hepático (os tecidos extra-hepáticos), por exemplo, os músculos esquelético, cardíaco e córtex renal, nos quais eles são oxidados pela via do ciclo do ácido cítrico para fornecer a maior parte da energia requerida por esses mesmos tecidos. Normalmente, o cérebro utiliza como combustível apenas a glicose. Entretanto, em condições de jejum prolongado (fome crônica), quando a glicose não está disponível, pode adaptar-se para usar o acetoacetato ou o D-β-hidroxibutirato na obtenção de energia. A produção dos corpos cetônicos pelo fígado e sua exportação para os tecidos extra-hepáticos em geral permitem a oxidação continuada dos ácidos graxos no fígado, mesmo quando o acetil-CoA não está sendo oxidado pelo ciclo do ácido cítrico.

Os corpos cetônicos sintetizados no fígado são exportados para outros órgãos

O primeiro passo na formação do acetoacetato no fígado (Fig. 17-16) é a condensação enzimática de duas moléculas de acetil-CoA catalisada pela tiolase; essa reação é a simples reversão do último passo da β-oxidação. Então, o acetoacetil-CoA condensa-se com acetil-CoA para formar o **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA** (HMG-CoA), o qual é quebrado para formar acetoacetato livre e acetil-CoA.

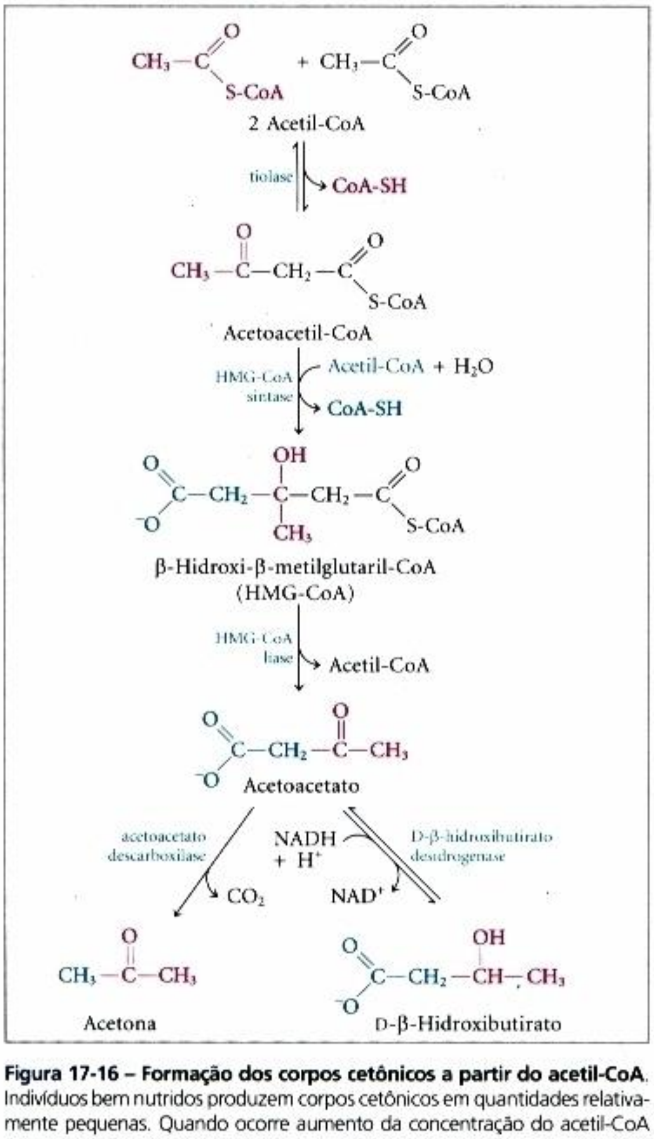

2 Acetil-CoA
tiolase
CoA-SH
Acetoacetil-CoA
HMG-CoA sintase
Acetil-CoA + H₂O
CoA-SH
β-Hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)
HMG-CoA liase
Acetil-CoA
Acetoacetato
acetoacetato descarboxilase
CO₂
NADH + H⁺
NAD⁺
D-β-hidroxibutirato desidrogenase
Acetona
D-β-Hidroxibutirato

Figura 17-16 – Formação dos corpos cetônicos a partir do acetil-CoA. Indivíduos bem nutridos produzem corpos cetônicos em quantidades relativamente pequenas. Quando ocorre aumento da concentração do acetil-CoA (jejum ou diabetes não-tratado, por exemplo), a tiolase catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando o acetoacetil-CoA, o progenitor dos três corpos cetônicos. Essas reações de síntese dos corpos cetônicos ocorrem no interior da matriz mitocondrial do fígado. O composto com seis átomos de carbono β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) é também um intermediário da biossíntese dos esteróis, mas a enzima que forma o HMG-CoA nessa via é citosólica. A HMG-CoA liase está presente na matriz mitocondrial.

O acetoacetato livre assim produzido é reduzido em D-β-hidroxibutirato (Fig. 17-16) por meio de uma reação reversível catalisada pela **D-β-hidroxibutirato desidrogenase**, uma enzima mitocondrial. Essa enzima é específica para o estereoisômero D; ela não age sobre o L-β-hidroxiacil-CoA e não deve ser confundida com a L-β-hidroxiacil-CoA desidrogenase, que age na via da β-oxidação. Nas pessoas sãs, a acetona é formada quando o acetoacetato perde um grupo carboxila, e isso ocorre em quantidades extremamente pequenas. O acetoacetato é facilmente descarboxilado; o grupo carboxila pode ser perdido espontaneamente ou pela ação da **acetoacetato descarboxilase** (Fig. 17-16). Como as pessoas diabéticas não-tratadas produzem grandes quantidades de acetoacetato, o seu sangue contém quantidades significativas de acetona. A acetona é volátil e confere um odor característico ao ar exalado, o que, às vezes, é útil no diagnóstico da severidade da doença.

Os tecidos extra-hepáticos usam os corpos cetônicos como combustível

Nos tecidos extra-hepáticos, o D-β-hidroxibutirato é oxidado até acetoacetato pela D-β-hidroxibutirato desidrogenase (Fig. 17-17). O acetoacetato é ativado para formar o éster da coenzima A por transferência de CoA do succinil-CoA, um intermediário do ciclo do ácido cítrico (veja Fig. 16-7), em uma reação catalisada pela **β-cetoacil-CoA transferase**. O acetoacetil-CoA é então clivado pela tiolase para liberar duas moléculas de acetil-CoA que entram no ciclo do ácido cítrico.

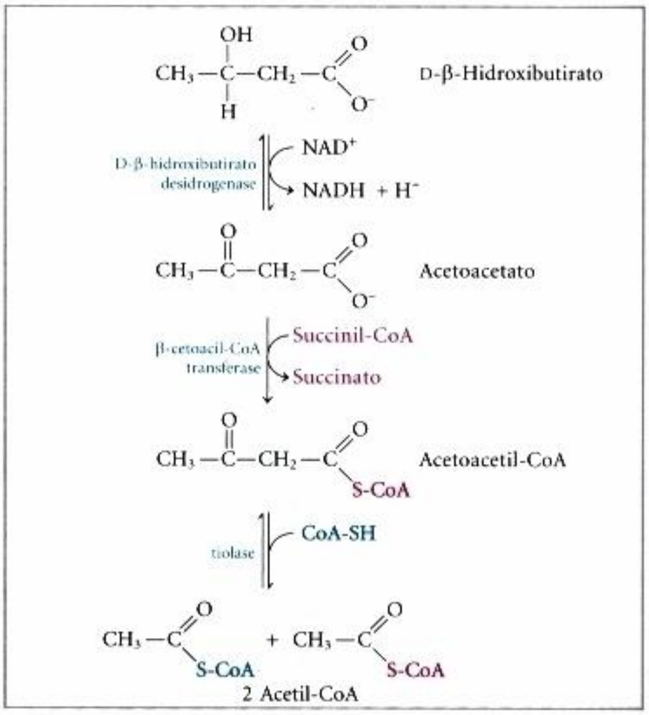

D-β-Hidroxibutirato
D-β-hidroxibutirato desidrogenase
NAD⁺
NADH + H⁺
Acetoacetato
β-cetoacil-CoA transferase
Succinil-CoA
Succinato
Acetoacetil-CoA
tiolase
CoA-SH
2 Acetil-CoA

Figura 17-17 – β-Hidroxibutirato como combustível. O D-β-hidroxibutirato sintetizado no fígado passa para a corrente sangüínea e assim chega aos outros tecidos nos quais, em um processo de três passos, é convertido em acetil-CoA. Primeiro ele é oxidado em acetoacetato, o qual é ativado com a coenzima A fornecida pelo succinil-CoA, e então quebrado pela tiolase. O acetil-CoA assim formado é empregado na produção de energia.

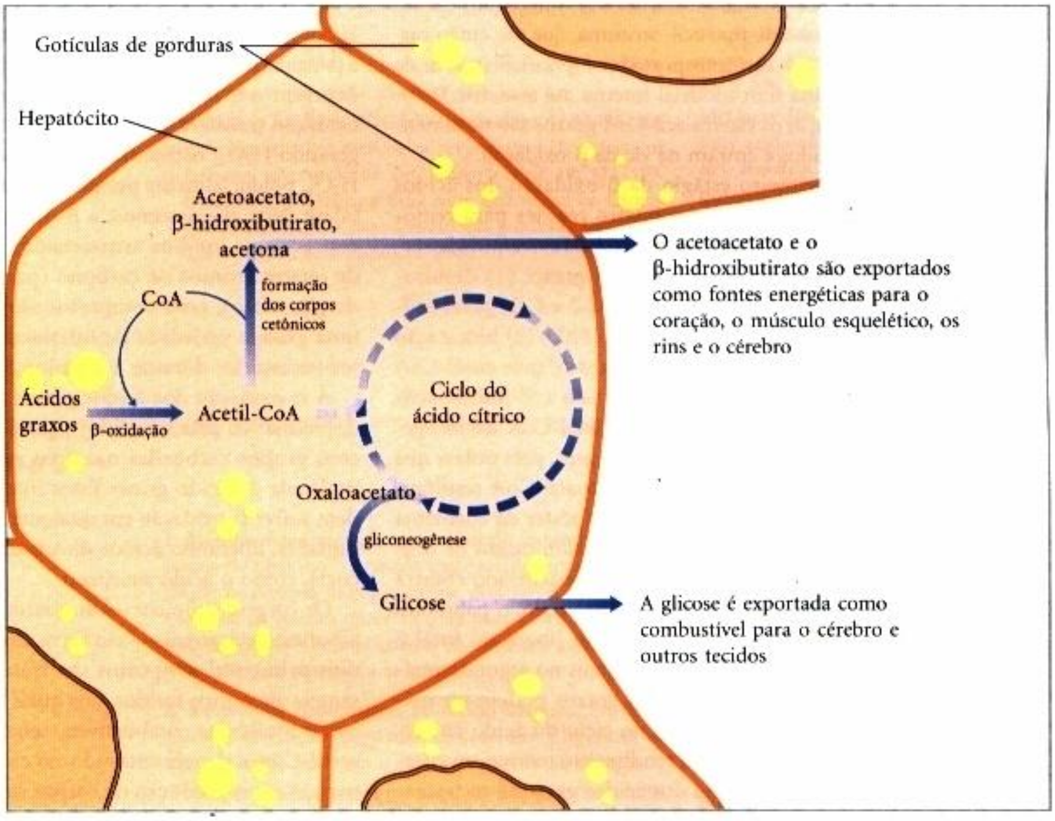
Os corpos cetônicos são produzidos em excesso no diabetes e durante o jejum prolongado

A produção e a exportação dos corpos cetônicos pelo fígado permitem a oxidação continuada dos ácidos graxos, mesmo com uma oxidação mínima do acetil-CoA no próprio fígado (Fig. 17-18). Quando, por exemplo, os intermediários do ciclo do ácido cítrico estão sendo empregados para a síntese da glicose, por meio da gliconeogênese, a oxidação dos intermediários do ciclo do ácido cítrico diminui e o mesmo ocorre com a oxidação do acetil-CoA. Além disso, o fígado contém uma quantidade limitada de coenzima A e, quando a maior parte dela está ligada nas moléculas do acetil-CoA, a β-oxidação dos ácidos graxos diminui de velocidade por falta dessa coenzima livre. A produção e a exportação dos corpos cetônicos liberam a coenzima A, permitindo que a oxidação dos ácidos graxos continue.

O jejum severo e prolongado ou o diabetes melito não-tratado levam a uma superprodução de corpos cetônicos à qual se associam problemas médicos muito sérios. Durante o jejum, a gliconeogênese retira a maior parte dos intermediários do ciclo de Krebs, desviando o acetil-CoA para a produção de corpos cetônicos (Fig. 17-18). No diabetes não-tratado, a insulina está presente em quantidade insuficiente e os tecidos extra-hepáticos não conseguem captar a glicose do sangue de forma eficiente (Capítulo 20). Para aumentar o nível da glicose sangüínea, a gliconeogênese no fígado é acelerada, o que também ocorre com a oxidação dos ácidos graxos no fígado e nos músculos, resultando em uma produção de corpos cetônicos em quantidade acima da capacidade de sua oxidação pelos tecidos extra-hepáticos. O aumento de acetoacetato e D-β-hidroxibutirato nos níveis sangüíneos diminui o pH do sangue, provocando uma condição conhecida como **acidose**. Uma acidose extrema pode provocar o coma e, em não raros casos, a morte. Os corpos cetônicos no sangue e na urina de diabéticos não-tratados podem atingir níveis extraordinariamente altos (Tabela 17-2); essa condição é conhecida como **cetose**. Em pessoas com dietas de conteúdo calórico muito baixo, as gorduras armazenadas no tecido adiposo tornam-se a maior fonte da energia. Os níveis de corpos cetônicos no sangue e na urina dessas pessoas devem ser acompanhados para evitar os perigos da ocorrência de acidose e cetose (cetoacidose).

Tabela 17-2 – Produção de corpos cetônicos na cetose diabética

	Excreção urinária (mg/24h)	Concentração no sangue (mg/100mL)
Normal	≤ 125	< 3
Cetose extrema (diabetes não-tratado)	5.000	90



O acetoacetato e o β-hidroxibutirato são exportados como fontes energéticas para o coração, o músculo esquelético, os rins e o cérebro

A glicose é exportada como combustível para o cérebro e outros tecidos

Figura 17-18 – Síntese dos corpos cetônicos e sua exportação pelo fígado. As situações que aumentam a gliconeogênese (diabetes não-tratado, jejum) desaceleram o ciclo do ácido cítrico (pelo consumo do oxaloacetato) e aumentam a conversão do acetil-CoA em acetoacetato. As moléculas de coenzima A liberadas permitem que a β-oxidação dos ácidos graxos ocorra de forma continuada.

Resumo

Os ácidos graxos componentes dos triacilgliceróis fornecem uma grande fração da energia oxidativa nos animais. Os triacilgliceróis ingeridos na alimentação são emulsificados no intestino delgado pelos sais biliares, hidrolisados por lipases intestinais, absorvidos pelas células epiteliais intestinais e reconvertidos em triacilgliceróis; são, a seguir, incluídos nos quilomícrons por meio da combinação com apolipoproteínas específicas. Os quilomícrons liberam os triacilgliceróis para os tecidos, nos quais a lipase lipoprotéica libera os ácidos graxos livres para entrar no interior das células. Os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo dos animais vertebrados são mobilizados pela ação de hormônios por meio de uma lipase que age sobre os triacilgliceróis e é sensível aos mesmos hormônios. Os ácidos graxos liberados por essa enzima ligam-se à albumina do soro e são transportados pelo sangue até o coração, o músculo esquelético e outros tecidos, em que esses ácidos graxos são empregados como combustível.

Uma vez no interior das células, os ácidos graxos livres são ativados na membrana mitocondrial externa por esterificação com a coenzima A, formando tioésteres acil-CoA graxos. Estes são convertidos em ésteres graxos do tipo acil-carnitina, que são então carregados por um transportador específico através da membrana mitocondrial interna até a matriz mitocondrial; aí os ésteres acil-CoA graxos são novamente formados e entram na via da β-oxidação.

No primeiro estágio da β-oxidação dos ácidos graxos, são necessárias quatro reações para remover cada unidade de acetil-CoA da extremidade carboxílica saturada do acil-CoA graxo: (1) desidrogenação dos carbonos α e β (C-2 e C-3) pelas acil-CoA desidrogenases unidas ao FAD; (2) hidratação resultante da dupla ligação *trans*-Δ^2 pela enoil-CoA hidratase; (3) desidrogenação do L-β-hidroxiacil-CoA resultante pela β-hidroxiacil-CoA desidrogenase ligada ao NAD; e (4) clivagem, pela tiolase que emprega coenzima A, do β-cetoacil-CoA resultante para formar acetil-CoA e o tioéster da coenzima A com o ácido graxo original, diminuído de dois átomos de carbono. O acil-CoA encurtado reentra na seqüência de reações. Por exemplo, o palmitato que tem 16 átomos de carbono libera no total 8 moléculas de acetil-CoA, as quais no segundo estágio da oxidação dos ácidos graxos podem ser oxidadas até CO_2 por meio do ciclo do ácido cítrico. Uma grande fração do rendimento teórico em energia livre da oxidação dos ácidos graxos é recuperada como ATP pela fosforilação oxidativa, o terceiro e último estágio da via oxidativa. Defeitos genéticos na desidrogenase que atua sobre os acil-CoAs de cadeia média são comuns nas populações do norte da Europa e dos Estados Unidos e provocam doenças graves.

A oxidação dos ácidos graxos insaturados requer a ação de duas enzimas adicionais: a enoil-CoA isomerase e a 2,4-dienoil-CoA redutase. Os ácidos graxos de número ímpar de átomos de carbono são oxidados pela via da β-oxidação, mas, ao final, liberam uma molécula de propionil-CoA. Este último é carboxilado e transformado em metilmalonil-CoA, o qual é isomerizado em succinil-CoA por uma reação catalisada pela metilmalonil-CoA mutase. Essa enzima requer a coenzima B_{12}, um co-fator complexo contendo um íon cobalto e um sistema em anel de corrina. A coenzima B_{12} está envolvida em um grande número de reações catalisadas enzimaticamente, nas quais um átomo de hidrogênio é trocado por um grupo funcional ligado em um átomo de carbono adjacente.

A oxidação dos ácidos graxos é finamente regulada. A ingestão de grandes quantidades de hidratos de carbono suprime a oxidação dos ácidos graxos em favor da biossíntese desses mesmos ácidos.

Os peroxissomos de plantas e animais e os glioxissomos das sementes em germinação conduzem a β-oxidação por quatro passos similares àqueles que ocorrem nas mitocôndrias. O primeiro passo de oxidação transfere os elétrons diretamente para O_2, gerando H_2O_2; nenhuma energia é conservada, e a H_2O_2, potencialmente perigosa, é destruída pela catalase. Nos glioxissomos, a β-oxidação serve para converter os lipídios armazenados em compostos de quatro átomos de carbono (por meio do ciclo do glioxalato); esses compostos são precursores de uma grande variedade de intermediários e produtos necessários durante a germinação da semente.

A ω-oxidação dos ácidos graxos no retículo endoplasmático produz ácidos graxos dicarboxílicos, com grupos carboxilas nas duas extremidades da molécula do ácido graxo. Esses intermediários podem sofrer β-oxidação em qualquer uma das extremidades, liberando ácidos dicarboxílicos de cadeia curta, como o ácido succínico.

Os corpos cetônicos — acetoacetato, D-β-hidroxibutirato e acetona — são formados no fígado. Os dois primeiros compostos são transportados pelo sangue até outros tecidos, nos quais eles funcionam como moléculas combustíveis, sendo oxidados até acetil-CoA e depois entrando no ciclo do ácido cítrico. A superprodução de corpos cetônicos no diabetes não-controlado por tratamento ou durante o jejum severo pode levar à cetose e à acidose.

Leitura Adicional

Geral

Boyer PD. (1983) *The Enzymes*, 3rd edn, Vol. 16: *Lipid Enzymology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA.

Gurr MI & Harwood JL. (1991) *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 4th edn, Chapman & Hall, London.

Langin D, Holm C, & Lafontan M. (1996) Adipocite hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 93-109.

Ramsay TG. (1996) Fat cells. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **25**, 847-870.

Uma revisão de todos os aspectos do armazenamento de gorduras e sua mobilização nos adipócitos.

Wang CS, Hartsuck J, & McConathy WJ. (1992) Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 1-17.

Estudo em nível avançado da enzima que libera ácidos graxos das lipoproteínas nos capilares dos músculos e do tecido adiposo.

β-oxidação mitocondrial

Bannerjee R. (1997) The yin-yiang of cobalamin biochemistry. *Chem. Biol.* **4**, 175-186.

Uma revisão da bioquímica das reações da coenzima B_{12}, incluindo a da metilmalonil-CoA mutase.

Eaton S, Bartlett K, & Pourfarzan M. (1996) Mammalian mitochondrial β-oxidation. *Biochem. J.* **320**, 345-357.

Uma revisão da enzimologia da β-oxidação, defeitos hereditários dessa via e regulação do processo na mitocôndria.

Harwood JL. (1988) Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 101-138.

Jeukendrup AE, Saris WH, & Wagenmakers AJ. (1998) Fat metabolism during exercise: a review. Part III: effects of nutritional interventions. *Int. J. Sports Med.* **19**, 371-379.

Esse artigo pertence a uma série que revisa os fatores que influenciam a mobilização das gorduras e sua utilização durante o exercício físico.

Kerner J & Hoppel C. (1998) Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Ann. Rev. Nutr.* **18**, 179-206.

Kunau WH, Dommes V, & Schulz H. (1995) β-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid. Res.* **34**, 267-342.

Uma revisão da história da β-oxidação e uma útil comparação dela em diferentes sistemas.

Rinaldo P, Raymond K, al-Odaib, A, & Bennet MJ. (1998) Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Curr. Opin. Pediatr.* **10**, 615-621.

Uma revisão dos defeitos metabólicos na oxidação das gorduras, incluindo as mutações MCAD.

Sherrat HS. (1994) Introduction: the regulation of fatty acid oxidation in cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 421-422.

Thorpe C & Kim JJ. (1995) Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J.* **9**, 718-725.

Uma descrição clara e breve da estrutura tridimensional e dos mecanismos catalíticos dessas enzimas.

β-oxidação nos peroxissomos

Hashimoto T. (1996) Peroxisomal β-oxidation: enzymology and molecular biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **804**, 86-98.

Manaerts GP & van Veldhoven PP. (1996) Functions and organization of peroxisomal β-oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **804**, 99-115.

Corpos cetônicos

Foster DW & McGarry JD. (1983) The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* **309**, 159-169.

McGarry JD & Foster DW. (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395-420.

Robinson AM & Williamson DH. (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* **60**, 143-187.

Problemas

1. Energia dos triacilgliceróis. Usando como base "por átomo de carbono" responda onde reside a maior quantidade de energia biologicamente disponível nos triacilgliceróis: na porção glicerol ou na porção ácidos graxos? Indique como o conhecimento da estrutura química dos triacilgliceróis fornece a resposta.

2. Reserva de combustível no tecido adiposo. Entre os grandes nutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios), os triacilgliceróis possuem o maior conteúdo de energia.

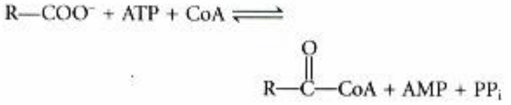
(a) Se 15% da massa corporal de um homem adulto de 70kg consiste de triacilgliceróis, calcule a reserva de combustível total, em kcal e em kJ, na forma desse tipo de gordura. Recorde que 1,00kcal = 4,18kJ.

(b) Se a necessidade energética basal é aproximadamente 8.400kJ/dia (2.000kcal/dia), por quanto tempo essa pessoa sobreviverá, se a oxidação dos ácidos graxos estocados como triacilgliceróis representar a única fonte de energia?

c) Qual será a perda de peso em gramas por dia sob essas condições de jejum?

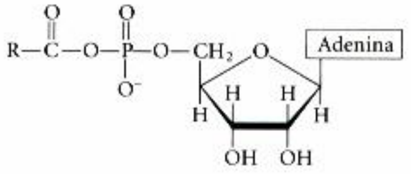
3. Reações comuns nos ciclos de oxidação dos ácidos graxos e do ácido cítrico. Freqüentemente as células seguem o mesmo modelo de reação enzimática para realizar reações metabólicas análogas. Por exemplo, os passos na oxidação do piruvato e do α-cetoglutarato a acetil-CoA e succinil-CoA, respectivamente, embora catalisados por enzimas diferentes, são muito semelhantes. O primeiro estágio na oxidação dos ácidos graxos segue uma seqüência de reações que lembram muito uma existente no ciclo do ácido cítrico. Mostre, por reações, as seqüências análogas de reações nas duas vias.

4. A química da reação catalisada pela acil-CoA sintetase. Os ácidos graxos são convertidos nos ésteres da coenzima A respectivos por meio da reação reversível catalisada pela acil-CoA sintetase:



$$R{-}COO^- + ATP + CoA \rightleftharpoons R{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}CoA + AMP + PP_i$$

(a) Um intermediário ligado à enzima foi identificado nesta reação como o anidrido misto do ácido graxo e da adenosina monofosfato (AMP), acil-AMP:



Escreva duas equações correspondentes à seqüência dos dois passos envolvidos na reação catalisada pela acetil-CoA sintetase tendo o acil-AMP como intermediário.

(b) A reação apresentada é livremente reversível, com constante de equilíbrio próxima de 1. De que maneira se poderá fazer esta reação favorecer a formação de acil-CoA graxo?

5. Oxidação do palmitato marcado com trítio. Uma amostra de palmitato marcado uniformemente com trítio (^3H) tem atividade específica de $2,48 \times 10^8$ pulsos por minuto (cpm) por micromol de palmitato. Uma porção dessa amostra é adicionada a uma suspensão de mitocôndrias que a oxida até acetil-CoA. Este é isolado e hidrolisado até acetato. A atividade específica do acetato isolado é $1,00 \times 10^7$cpm por micromol de acetato. Esse resultado é consistente com a via de β-oxidação? Explique. Qual é o destino final do trítio removido?

6. Compartimentalização celular na β-oxidação. Antes de ser oxidado na mitocôndria, o palmitato livre é ativado no citosol como derivado de coenzima A (palmitoil-CoA). Se uma mistura de palmitato e [^{14}C] coenzima A é adicionada a um homogeneizado de fígado, o palmitoil-CoA isolado da fração citosólica é radioativo, mas o isolado da fração mitocondrial não é. Explique.

7. Bioquímica comparativa: vias geradoras de energia em pássaros. Uma indicação da importância relativa de diferentes vias metabólicas liberadoras de energia, ou seja, produtoras de ATP, é a $V_{máx}$ de determinadas enzimas dessas vias. As $V_{máx}$ de várias enzimas dos músculos peitorais do pombo (empregados para voar) e do faisão estão relacionadas a seguir:

Enzima	$V_{máx}$ (μmol do substrato/min/g de tecido)	
	Pombo	**Faisão**
Hexoquinase	3,0	2,3
Fosforilase do glicogênio	18,0	120,0
Fosfofrutoquinase-1	24,0	143,0
Citrato sintase	100,0	15,0
Triacilglicerol lipase	0,07	0,01

(a) Discuta a importância relativa do metabolismo do glicogênio em relação ao metabolismo dos lipídios na geração de ATP nos músculos peitorais desses pássaros.

(b) Compare o consumo provável de oxigênio nos dois pássaros.

(c) Julgando pelos dados da tabela, diga qual dos dois é aquele que voa por longas distâncias. Justifique sua resposta.

(d) Por que as enzimas apresentadas foram as escolhidas para a comparação? As atividades da triose fosfato isomerase e da malato desidrogenase seriam igualmente boas bases para comparação? Explique.

8. Efeito da deficiência de carnitina. Um paciente desenvolve uma doença caracterizada por fraqueza muscular progressiva e espasmos musculares dolorosos. Esses sintomas são agravados pelo jejum, exercícios e uma dieta rica em gorduras. O homogeneizado de uma amostra de músculo do paciente oxida o oleato adicionado mais lentamente do que os homogeneizados de amostras de músculo obtidas de indivíduos saudáveis. Quando a carnitina foi adicionada ao homogeneizado do músculo do paciente, a velocidade de oxidação do oleato se igualou àquela dos homogeneizados-controle. O paciente foi diagnosticado como tendo uma deficiência de carnitina.

(a) Por que a carnitina adicionada aumenta a velocidade de oxidação do oleato no homogeneizado de músculo do paciente?

(b) Por que os sintomas são agravados pelo jejum, exercício e a dieta rica em gorduras?

(c) Sugira duas possíveis razões para a deficiência de carnitina no músculo do paciente.

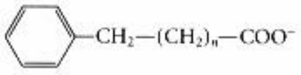
9. Os ácidos graxos como fonte de água. Contrariamente à lenda, os camelos não acumulam água em sua corcova, que, na realidade, é um grande depósito de gordura. Como esse depósito de gordura funciona como uma fonte de água? Calcule a quantidade de água (litros) que pode ser produzida pelo camelo a partir de um quilograma de gordura. Para simplificar, suponha que a gordura consista inteiramente de tripalmitoilglicerol.

10. O petróleo como fonte alimentar para micróbios. Alguns microrganismos do gênero *Nocardia* e *Pseudomonas* podem crescer em um ambiente no qual a única fonte alimentar são hidrocarbonetos. Essas bactérias oxidam os hidrocarbonetos alifáticos de cadeia reta, como a octana, a seus ácidos carboxílicos correspondentes:

$$CH_3(CH_2)_6CH_3 + NAD^+ + O_2 \rightleftharpoons CH_3(CH_2)_6COOH + NADH + H^+$$

Como essas bactérias podem ser empregadas para limpar a poluição provocada por vazamentos de petróleo?

11. Metabolismo de ácidos graxos com cadeia reta ligada a um grupo fenil. Um coelho recebeu na alimentação um ácido graxo de cadeia reta contendo um grupo fenil na posição terminal:



Posteriormente, isolou-se da urina desse animal um metabólito cristalino e ácido quando em solução aquosa. Uma amostra de 302mg do metabólito foi completamente neutralizada pela adição de 22,2mL de NaOH 0,1M.

(a) Qual é o peso molecular provável desse metabólito e qual a sua estrutura?

(b) O ácido graxo de cadeia linear fornecido ao coelho contém um número par ou ímpar de grupos metilênicos (—CH_2—), isto é, *n* é par ou ímpar? Explique.

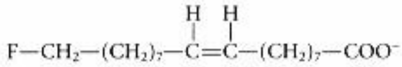
12. Oxidação dos ácidos graxos nos diabéticos. Quando a quantidade de acetil-CoA produzida durante a β-oxidação no fígado excede a capacidade do ciclo do ácido cítrico de oxidá-la, o excesso de acetil-CoA reage para formar os corpos cetônicos, D-β-hidroxibutirato, acetoacetato e acetona. Essa condição existe no diabetes severo porque os tecidos dos portadores dessa moléstia são incapazes de utilizar a glicose e oxidam grandes quantidades de ácidos graxos em seu lugar. Embora o acetil-CoA não seja tóxico, a mitocôndria precisa transformá-lo. Por quê? Como essa transformação resolve o problema?

13. Conseqüências de uma dieta rica em gorduras e desprovida de carboidratos. Suponha que você precise sobreviver com uma dieta consistindo exclusivamente de gordura de baleia ou foca, sem nenhum, ou muito pouco, carboidrato.

(a) Qual o efeito da privação de carboidratos sobre a utilização de gorduras para obtenção de energia?

(b) Se a sua dieta fosse totalmente desprovida de carboidratos, qual tipo de ácido graxo seria melhor consumir: aqueles com número par ou ímpar de átomos de carbono? Explique.

14. Conseqüências metabólicas da ingestão de ω-fluoroleato. O arbusto *Dichapetalum toxicanium*, que cresce no país africano Serra Leoa, produz ω-fluoroleato, que é muito tóxico para animais de sangue quente.



$$F{-}CH_2{-}(CH_2)_7{-}\overset{H}{\overset{|}{C}}{=}\overset{H}{\overset{|}{C}}{-}(CH_2)_7{-}COO^-$$

ω-Fluoroleato

Essa substância tem sido empregada como veneno para ponta de flechas e o pó da sua fruta dessecada da planta usado como veneno para ratos (daí o nome comum local da planta: *ratsbane*). Por que essa substância é tão tóxica? (Dica: reveja o Problema 13 no Capítulo 16.)

15. Papel do FAD como receptor de elétrons. A acil-CoA desidrogenase usa o FAD ligado à enzima como grupo prostético para desidrogenar os carbonos α e β do acil-CoA graxo. Qual é a vantagem de usar o FAD como receptor de elétrons em lugar do NAD^+? Explique em termos do potencial-padrão de redução para as meias-reações enzima-FAD/$FADH_2$ ($E'^{\circ} = -0{,}219V$) e NAD^+/NADH ($E'^{\circ} = -0{,}320V$).

16. β-oxidação do ácido araquidônico. Quantas voltas do ciclo de oxidação dos ácidos graxos são necessárias para oxidar completamente o ácido araquidônico até acetil-CoA? (veja Tabela 11-1).

17. Destino do propionato marcado. Se o [3-^{14}C]propionato (^{14}C no grupo metil) for adicionado a um homogeneizado de fígado, produz-se rapidamente o oxaloacetato marcado com ^{14}C. Desenhe um fluxograma do caminho pelo qual o propionato é transformado em oxaloacetato e indique a localização do ^{14}C no oxaloacetato.

18. Fontes de H_2O produzida na β-oxidação. A oxidação completa do palmitoil-CoA até dióxido de carbono e água é representada pela equação geral:

$$\text{Palmitoil-CoA} + 23O_2 + 108P_i + 108ADP \longrightarrow CoA + 16CO_2 + 108ATP + 23H_2O$$

Água também é produzida na reação

$$ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O$$

Por que essa água não está incluída como produto da reação?

19. Importância biológica do cobalto. Os bovinos, os veados, as ovelhas e outros animais ruminantes produzem grandes quantidades de propionato no rúmen pela fermentação bacteriana da matéria vegetal que eles ingerem. Para esses animais, esse propionato é a principal fonte de glicose pela seguinte via:

$$\text{Propionato} \longrightarrow \text{oxaloacetato} \longrightarrow \text{glicose}$$

Em algumas regiões do mundo, notadamente na Austrália, os animais ruminantes, algumas vezes, mostram sintomas de anemia com concomitante perda do apetite e atraso do crescimento. Esses sintomas resultam da incapacidade do animal de transformar propionato em oxaloacetato, o que é provocado pela ingestão insuficiente de cobalto devido aos níveis muito baixos de cobalto no solo. Explique.

20. Consumo de lipídios durante a hibernação. Os ursos consomem ao redor de 25×10^6J/dia durante o período de hibernação, o qual pode durar em torno de sete meses. A energia necessária para manter a vida durante esse período é obtida da oxidação de ácidos graxos. Quanta massa é perdida (em quilogramas) depois de sete meses? Como a cetose pode ser minimizada durante a hibernação?

CAPÍTULO 18

A Oxidação dos Aminoácidos e a Produção de Uréia

Uma vista da ilha de San Lorenzo, uma das ilhas do guano, ao longo da costa do Peru. Centenas de milhares de pássaros, albatrozes dos pés negros, fazem seus ninhos nessas ilhas. Os pássaros excretam seus grupos amino em excesso, como ácido úrico, que é o componente principal do guano. Ao longo dos séculos, foram depositadas enormes quantidades de guano, formando estruturas que simulam rochedos íngremes. O guano é um fertilizante agrícola valioso graças a seu rico conteúdo em nitrogênio.

Vamos, agora, estudar o catabolismo dos aminoácidos, a última classe de biomoléculas que, por meio de sua degradação oxidativa, faz uma contribuição significativa para a liberação de energia metabólica. O valor da fração de energia metabólica derivada dos aminoácidos varia muito com o tipo de organismo considerado e com a situação metabólica em que ele se encontra. Imediatamente após uma refeição, os carnívoros podem obter da oxidação dos aminoácidos até 90% das suas necessidades de energia. Os herbívoros podem obter, dessa fonte, apenas uma pequena fração de suas necessidades energéticas. A maioria dos microrganismos pode retirar aminoácidos do seu ambiente e esses aminoácidos podem ser oxidados como combustível quando requeridos pelas condições metabólicas. Por outro lado, os vegetais raramente oxidam os aminoácidos para obter energia. Em vez disso, por meio da fotossíntese, eles convertem CO_2 e H_2O em carboidratos, que são usados quase exclusivamente como fonte de energia. As quantidades dos diferentes aminoácidos nos tecidos vegetais são cuidadosamente reguladas para ser apenas suficientes para satisfazer as necessidades de biossíntese de proteínas de ácidos nucléicos e de umas poucas outras moléculas necessárias para o crescimento. O catabolismo dos aminoácidos ocorre nas plantas, mas ele é, em geral, destinado à produção de metabólitos para outras vias biossintéticas.

Nos animais, os aminoácidos podem sofrer degradação oxidativa em três circunstâncias metabólicas diferentes:

1. Durante a síntese e a degradação normais das proteínas celulares (renovação ou "turnover" das proteínas; Capítulo 27), alguns dos aminoácidos liberados, durante a quebra das proteínas, sofrerão degradação oxidativa, caso não sejam necessários para a síntese de novas proteínas.
2. Quando, devido a uma dieta rica em proteínas, os aminoácidos são ingeridos em excesso, com relação às necessidades corporais de biossíntese de proteínas, o excedente é catabolizado, já que os aminoácidos livres não podem ser armazenados.
3. Durante o jejum severo ou o diabetes melito, quando os carboidratos estão inacessíveis ou não são utilizados adequadamente, as proteínas corporais serão hidrolisadas e seus aminoácidos empregados como combustível utilizado.

Em todas essas circunstâncias metabólicas, os aminoácidos perdem seus grupos amino e os α-cetoácidos assim formados podem sofrer oxidação até CO_2 e H_2O. Em adição, e com freqüência de forma igualmente importante, os "esqueletos carbônicos" dos aminoácidos fornecem unidades de três e quatro átomos de carbono, que são convertidas em glicose, a qual, por sua vez, pode suprir as necessidades energéticas das funções do cérebro, dos músculos e de outros tecidos.

As vias de degradação dos aminoácidos são muito similares na maioria dos organismos. O enfoque deste capítulo será sobre os vertebrados, porque o catabolismo dos aminoácidos nesses organismos tem recebido a maior parte da atenção dos pesquisadores. Como nos casos das vias metabólicas dos açúcares e dos ácidos graxos, os processos de degradação dos aminoácidos convergem para as vias catabólicas centrais do metabolismo do carbono. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos, em geral, encaminham-se para o ciclo do ácido cítrico. Em alguns casos, as reações das vias são passos estreitamente paralelos àqueles dos catabolismos dos ácidos graxos (Capítulo 17).

Entretanto, uma característica muito importante distingue a degradação dos aminoácidos dos processos catabólicos descritos até agora: todos os aminoácidos contêm um grupo amino. Portanto, cada via degradativa passa por um passo-chave, no qual o grupo α-amino é separado do esqueleto carbônico e desviado para uma via especializada para o metabolismo desse grupo (Fig. 18-1). Trataremos primeiro do metabolismo do agrupamento amino e da excreção do nitrogênio e depois do destino dos esqueletos carbônicos derivados dos aminoácidos e, ao mesmo tempo, veremos como essas vias são interconectadas.

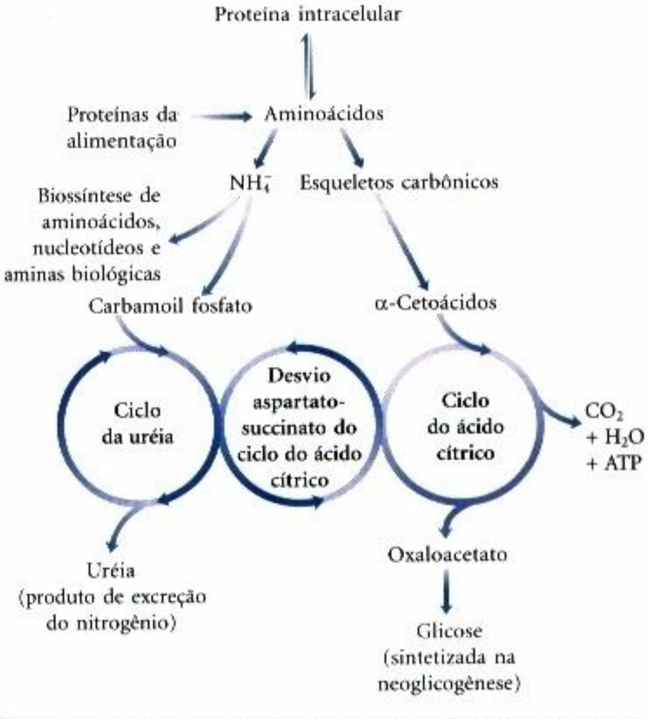

Proteína intracelular
Proteínas da alimentação
Aminoácidos
NH_4^+
Esqueletos carbônicos
Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e aminas biológicas
Carbamoil fosfato
α-Cetoácidos
Ciclo da uréia
Desvio aspartato-succinato do ciclo do ácido cítrico
Ciclo do ácido cítrico
CO_2 + H_2O + ATP
Uréia (produto de excreção do nitrogênio)
Oxaloacetato
Glicose (sintetizada na neoglicogênese)

Figura 18-1 – Resumo do catabolismo dos aminoácidos nos mamíferos. Os grupos amino e o esqueleto carbônico, remanescente dos aminoácidos, entram em vias metabólicas separadas, mas interconectadas.

Destino Metabólico dos Grupos Amino

O nitrogênio atmosférico (N_2) é abundante, porém quimicamente muito inerte para ser empregado na maioria dos processos bioquímicos. Como apenas uns poucos microrganismos podem converter N_2 em formas biologicamente úteis como a amônia (NH_3) (descritos no Capítulo 22), os grupos amino são utilizados com enorme economia nos sistemas biológicos.

Uma visão geral do catabolismo da amônia e dos grupos amino nos vertebrados está apresentada na Figura 18-2a. Os aminoácidos derivados das proteínas dos alimentos são a fonte da maioria dos grupos amino. A maior parte dos aminoácidos é metabolizada no fígado. Parte da amônia, assim gerada, é reciclada e empregada em uma grande variedade de processos biossintéticos; dependendo do organismo, o excesso é excretado diretamente ou convertido em uréia ou ácido úrico para excreção (Fig. 18-2b). A amônia em excesso, gerada em outros tecidos (extra-hepáticos), é transportada até o fígado (na forma de grupos amino, como descrito a seguir) para conversão na forma apropriada de excreção.

O glutamato e a glutamina desempenham papéis especialmente críticos no metabolismo do nitrogênio. No citosol dos hepatócitos, os grupos amino da maioria dos aminoácidos são transferidos para o α-cetoglutarato para formar glutamato. O glutamato é então transportado para o interior da mitocôndria, onde seu grupo amino é removido para formar NH_4^+. O excesso de amônia, gerado na maior parte dos outros tecidos, é convertido no nitrogênio amida da glutamina e, nessa forma, transportado para a mitocôndria do fígado. Na maioria dos tecidos, um ou outro desses dois aminoácidos é encontrado em concentrações que são grandes, quando comparadas àquelas dos demais aminoácidos.

Nos músculos, os grupos amino em excesso são quase todos transferidos para o piruvato, com a respectiva formação de alanina. A alanina é outra molécula importante no transporte dos grupos amino, transportando-os dos músculos até o fígado.

Iniciamos, agora, nosso estudo, com a discussão sobre a hidrólise das proteínas da alimentação em aminoácidos e, a seguir, faremos uma descrição geral dos destinos metabólicos dos grupos amino.

As proteínas dos alimentos ingeridos são enzimaticamente degradadas em aminoácidos

Nos seres humanos, a degradação das proteínas ingeridas em seus aminoácidos constituintes ocorre no trato gastrintestinal. A entrada das proteínas no estômago estimula a mucosa gástrica a secretar o hormônio **gastrina**, o qual, por sua vez, estimula a secreção do ácido clorídrico pelas células parietais das glândulas gástricas (Fig. 18-3a) e do pepsinogênio pelas células principais. A acidez do suco gástrico (pH 1,0 a 2,5) age como um antisséptico e mata a maioria das bactérias e outras células estranhas, como um agente desnaturante, desonevelando as proteínas globulares e tornando suas ligações peptídicas internas mais acessíveis à ação das enzimas hidrolíticas. O **pepsinogênio** (M_r 40.000), um precursor inativo ou zimogênio (veja Fig. 8-31), é convertido em pepsina ativa no suco gástrico, pela ação enzimática da própria pepsina. Nesse processo 42 resíduos de aminoácidos são removidos da extremidade aminoterminal da cadeia polipeptídica. A porção da molécula que permanece intacta é a **pepsina** enzimaticamente ativa (M_r 33.000). No estômago, a pepsina hidrolisa as proteínas ingeridas nas ligações peptídicas do lado aminoterminal dos resíduos de aminoácidos aromáticos, tirosina, fenilalanina e triptofano (veja Tabela 5-7), rompendo as longas cadeias polipeptídicas em uma mistura de peptídeos menores.

À medida que o conteúdo ácido do estômago passa para o intestino delgado, seu pH baixo estimula a secreção para o sangue do hormônio **secretina**. A secretina estimula o pâncreas a secretar bicarbonato no intestino delgado a fim de neutralizar o HCl gástrico, aumentando abruptamente o pH até perto do valor 7,0. (Todas as secreções do pâncreas exócrino passam para o intestino delgado por meio do ducto pancreático.) A digestão das proteínas continua a ocorrer no intestino delgado. A entrada de aminoácidos na parte superior do intestino (duodeno) libera o hormônio **colecistoquinina**, que estimula a secreção de

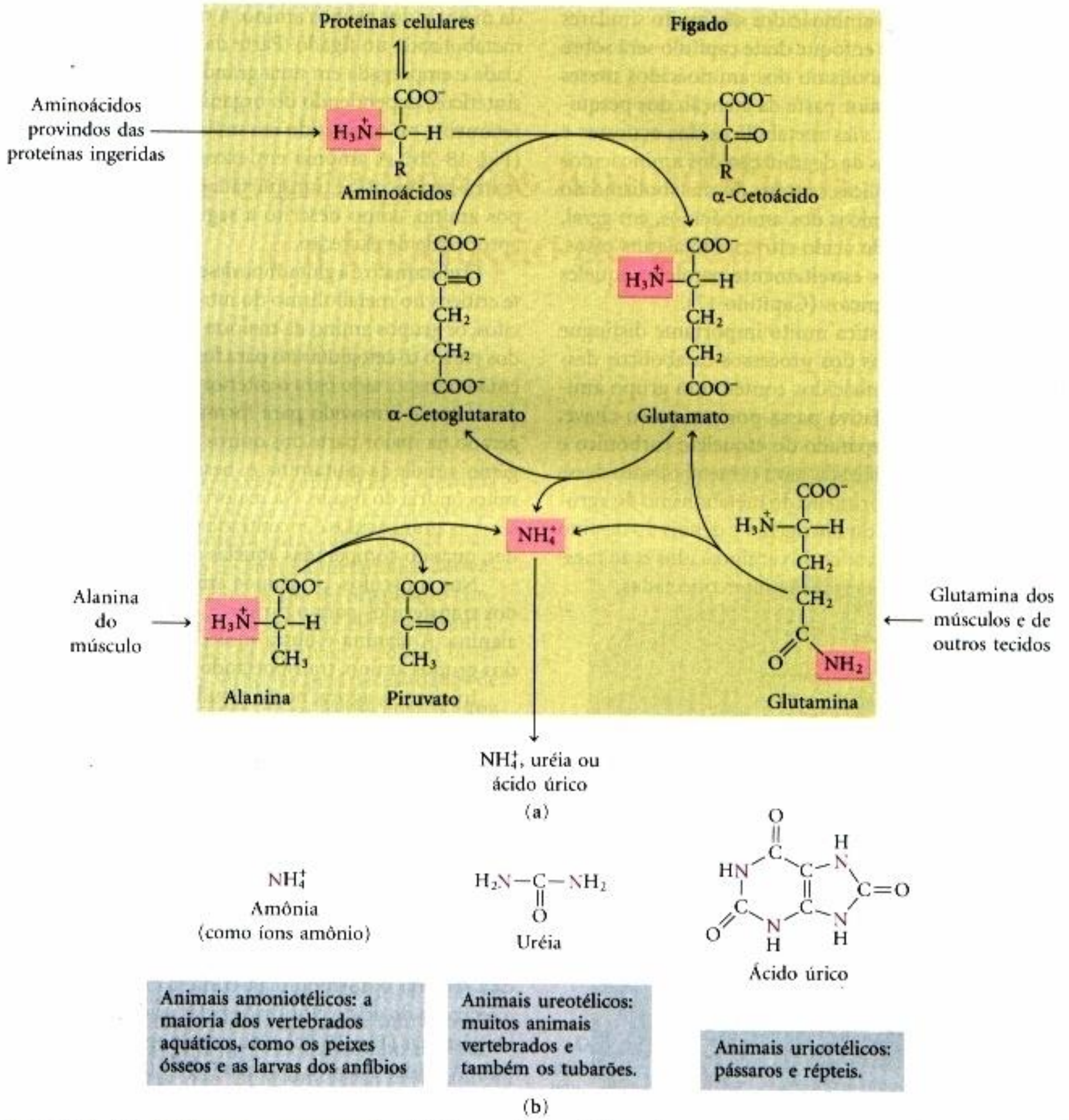

Proteínas celulares
Fígado
Aminoácidos provindos das proteínas ingeridas
COO⁻
H₃N⁺—C—H
R
Aminoácidos
COO⁻
C=O
R
α-Cetoácido
COO⁻
C=O
CH₂
CH₂
COO⁻
α-Cetoglutarato
COO⁻
H₃N⁺—C—H
CH₂
CH₂
COO⁻
Glutamato
NH₄⁺
Alanina do músculo
COO⁻
H₃N⁺—C—H
CH₃
Alanina
COO⁻
C=O
CH₃
Piruvato
COO⁻
H₃N⁺—C—H
CH₂
CH₂
C
O
NH₂
Glutamina
Glutamina dos músculos e de outros tecidos
NH₄⁺, uréia ou ácido úrico
(a)
NH₄⁺
Amônia (como íons amônio)
H₂N—C—NH₂
O
Uréia
O
H
HN
N
C=O
O
N
H
H
Ácido úrico
Animais amoniotélicos: a maioria dos vertebrados aquáticos, como os peixes ósseos e as larvas dos anfíbios
Animais ureotélicos: muitos animais vertebrados e também os tubarões.
Animais uricotélicos: pássaros e répteis.
(b)

Figura 18-2 – Catabolismo dos grupos amino. (**a**) Resumo do catabolismo dos grupos amino no fígado dos vertebrados (sombreado). (**b**) Formas de excreção do nitrogênio. O excesso de NH_4^+ é excretado como amônia (micróbios, peixes ósseos), como uréia (a maioria dos vertebrados terrestres) ou ácido úrico (pássaros e répteis terrestres). Note que os átomos de carbono e nitrogênio da uréia e do ácido úrico estão em estado de oxidação alto. O organismo excreta carbono somente após ter extraído dele a maior parte da energia de oxidação disponível.

várias enzimas pancreáticas que exibem atividade ótima em valores de pH entre 7,0 e 8,0. **Tripsinogênio, quimotripsinogênio** e **procarboxipeptidases A** e **B**, os zimogênios da **tripsina**, **quimotripsina** e **carboxipeptidases A** e **B**, são sintetizados e secretados pelas células exócrinas do pâncreas (Fig. 18-3b). O tripsinogênio é transformado em sua forma ativa, a tripsina, pela **enteropeptidase**, uma enzima proteolítica secretada pelas células intestinais. A tripsina catalisa, então, a conversão de mais tripsinogênio em tripsina (veja Fig. 8-31). A tripsina também ativa o quimotripsinogênio, as procarboxipetidases e a proelastase.

A síntese dessas enzimas digestivas como precursores inativos protege as células exócrinas de ataques proteolíticos destrutivos. O pâncreas, ainda, protege a si mesmo contra a autodigestão de outra forma — ele sintetiza um inibidor específico, uma proteína chamada **inibidor pancreático da tripsina** (pág. 220), que previne eficientemente a produção prematura das enzimas proteolíticas ativas no interior das células pancreáticas.

Assim, a tripsina e a quimotripsina hidrolisam em peptídeos menores os peptídeos resultantes da ação da pepsina no estômago. Esse estágio da digestão protéica é realizado muito eficientemente, porque as enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina possuem diferentes especificidades de aminoácidos para sua ação proteolítica. A tripsina hidrolisa as ligações peptídicas cujos grupos carbonila são fornecidos por resíduos de lisina ou arginina; a quimotripsina hidrolisa ligações peptídicas cujos grupos carbonila são fornecidos por resíduos de fenilalanina, tirosina ou triptofano (veja Tabela 5-7).

A degradação dos pequenos peptídeos é realizada por outras peptidases no intestino delgado. Entre essas peptidases estão as carboxipeptidases A e B, enzimas que contêm zinco e removem sucessivos resíduos carboxiterminais dos peptídeos. O intestino delgado também secreta uma **aminopeptidase**, que pode hidrolisar sucessivos resíduos aminoterminais de pequenos peptídeos. Pela ação seqüencial dessas enzimas proteolíti-

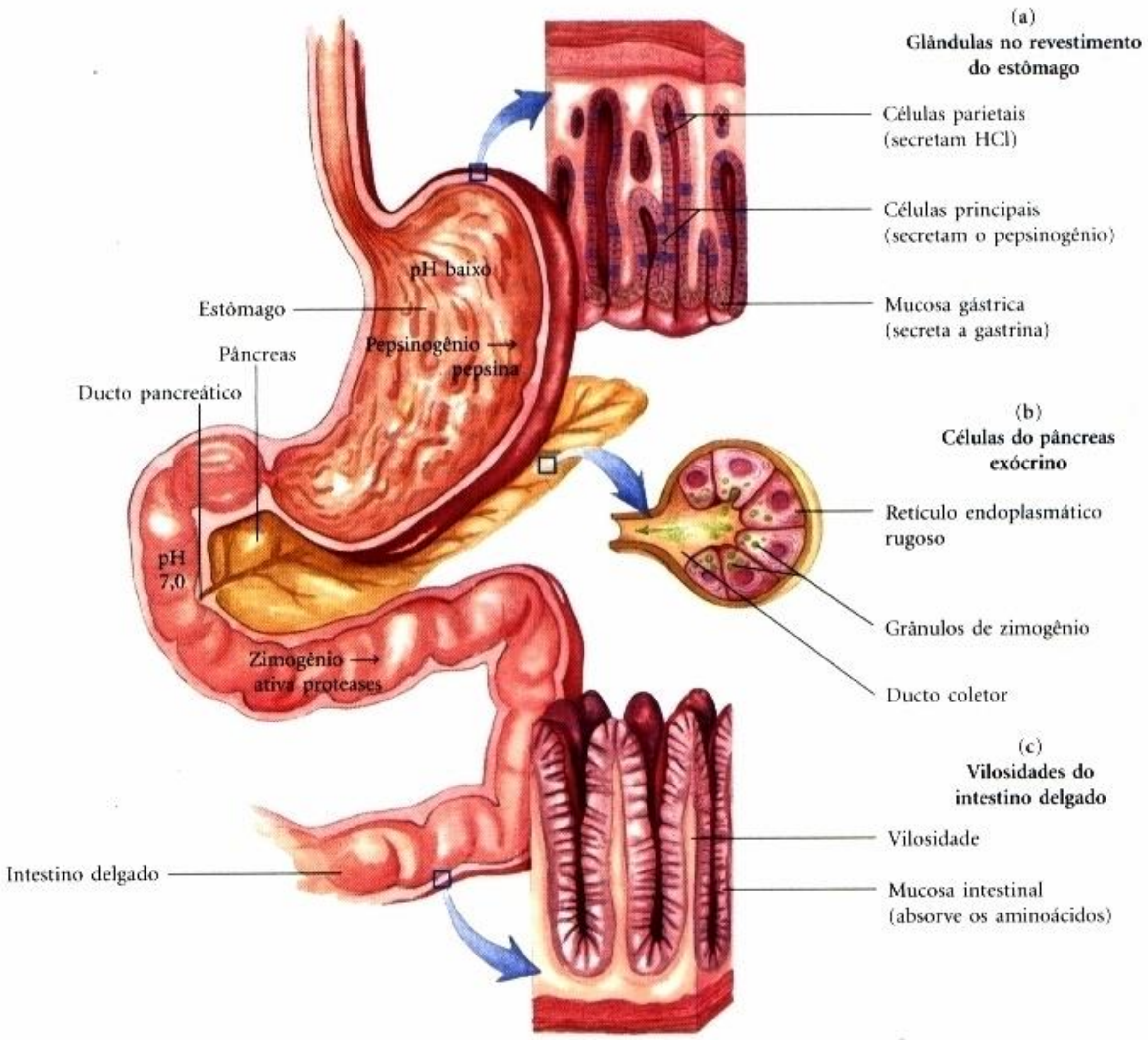

(a)
Glândulas no revestimento do estômago
Células parietais (secretam HCl)
Células principais (secretam o pepsinogênio)
Mucosa gástrica (secreta a gastrina)
pH baixo
Estômago
Pepsinogênio → pepsina
Pâncreas
Ducto pancreático
(b)
Células do pâncreas exócrino
Retículo endoplasmático rugoso
pH 7,0
Grânulos de zimogênio
Zimogênio → ativa proteases
Ducto coletor
(c)
Vilosidades do intestino delgado
Vilosidade
Intestino delgado
Mucosa intestinal (absorve os aminoácidos)

Figura 18-3 – Uma porção do trato digestivo humano (trato gastrintestinal). (**a**) As glândulas gástricas no tecido de revestimento interno do estômago. As células parietais e as células principais secretam seus produtos em resposta ao hormônio gastrina. A pepsina inicia o processo de hidrólise das proteínas no estômago. (**b**) As células exócrinas do pâncreas. O citoplasma delas é completamente preenchido com o retículo endoplasmático rugoso. Nele, os ribossomos sintetizam as cadeias polipeptídicas dos zimogênios de muitas enzimas digestivas. Os zimogênios são concentrados em vesículas que se condensam formando, por fim, os grânulos maduros de zimogênio. Quando a célula é estimulada, a membrana plasmática funde-se com a membrana ao redor dos grânulos de zimogênio e estes são lançados na luz dos ductos coletores por exocitose. Os ductos coletores têm como destino final o ducto pancreático e, depois, o intestino delgado. (**c**) As vilosidades do intestino delgado. Os aminoácidos são absorvidos através da camada de células epiteliais (mucosa intestinal) e entram nos capilares. Lembre-se de que, em seguida à absorção pela mucosa do intestino delgado, os produtos da hidrólise dos lipídios entram no sistema linfático (veja Fig. 17-1).

cas e peptidases, as proteínas ingeridas são **hidrolisadas** até uma mistura de aminoácidos **livres**, que podem então ser transportados por meio das células epiteliais que, por sua vez, recobrem internamente o intestino delgado (Fig. 18-3c). Os aminoácidos livres entram nos capilares sangüíneos das vilosidades e são transportados até o fígado.

Nos seres humanos, a maioria das proteínas globulares de origem animal é quase completamente hidrolisada em aminoácidos, mas algumas proteínas fibrosas, como a queratina, são apenas parcialmente digeridas. Muitas proteínas de alimentos vegetais, como os grãos de cereais, são incompletamente digeridas, porque a parte protéica dos grãos das sementes é revestida por envoltórios celulósicos inatacáveis por nossas enzimas digestivas.

A **pancreatite aguda** é uma patologia provocada pela obstrução da via normal pela qual as secreções do pâncreas atingem o intestino. Os zimogênios são prematuramente ativados em suas formas catalíticas ativas no *interior* das células do órgão e promovem a destruição do tecido pancreático. Isso provoca dor abdominal intensa e destruição parcial do órgão, o que pode ser mortal.

O piridoxal fosfato participa da transferência dos grupos α-amino para o α-cetoglutarato

Quando os L-**aminoácidos** chegam ao fígado, o primeiro passo no seu catabolismo é a remoção dos grupos α-amino promovida por enzimas chamadas **aminotransferases** ou **transaminases.** Nessas reações de **transaminação,** o grupo α-amino é transferido para o átomo de carbono α do α-cetoglutarato, produzindo o respectivo α-cetoácido análogo do aminoácido (Fig. 18-4). Nessas reações, não ocorre uma desaminação líquida final (isso é, perda de grupos amino), pois o α-cetoglutarato torna-se aminado à medida que o α-aminoácido é desaminado. O efeito das reações de transaminação é coletar os grupos amino de muitos aminoácidos diferentes na forma de apenas um, o L-

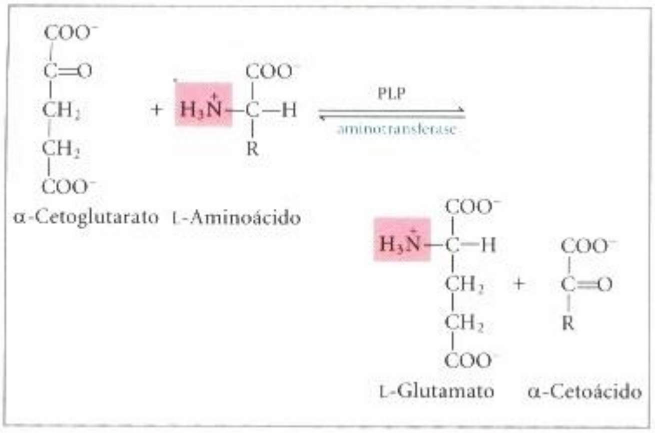


Figura 18-4 – Transaminações catalisadas por enzimas. Em muitas reações das aminotransferases, o α-cetoglutarato é o receptor do grupo amino. O piridoxal fosfato (PLP) é o co-fator de todas as aminotransferases.

glutamato. O glutamato conduz os grupos amino para ser utilizados por vias biossintéticas ou, então, para uma seqüência final de reações pelas quais são formados produtos nitrogenados degradados que, a seguir, são excretados.

As células contêm várias aminotransferases diferentes, muitas específicas para o α-cetoglutarato, como o receptor do grupo amino. As aminotransferases diferem na sua especificidade para o outro substrato, o L-aminoácido, que cede o grupo amino, e recebem nomes a partir do aminoácido doador do grupo amino. As reações catalisadas pelas aminotransferases são livremente reversíveis, tendo uma constante de equilíbrio de aproximadamente 1,0 ($\Delta G'^{\circ} \approx 0$kJ/mol).

Todas as aminotransferases possuem um grupo prostético comum e um mecanismo de reação também comum. O grupo prostético é o **piridoxal fosfato (PLP)**, a forma de coenzima da piridoxina ou vitamina B_6. O piridoxal fosfato foi brevemente introduzido no Capítulo 15 (pág. 424) como um co-fator na reação da fosforila-

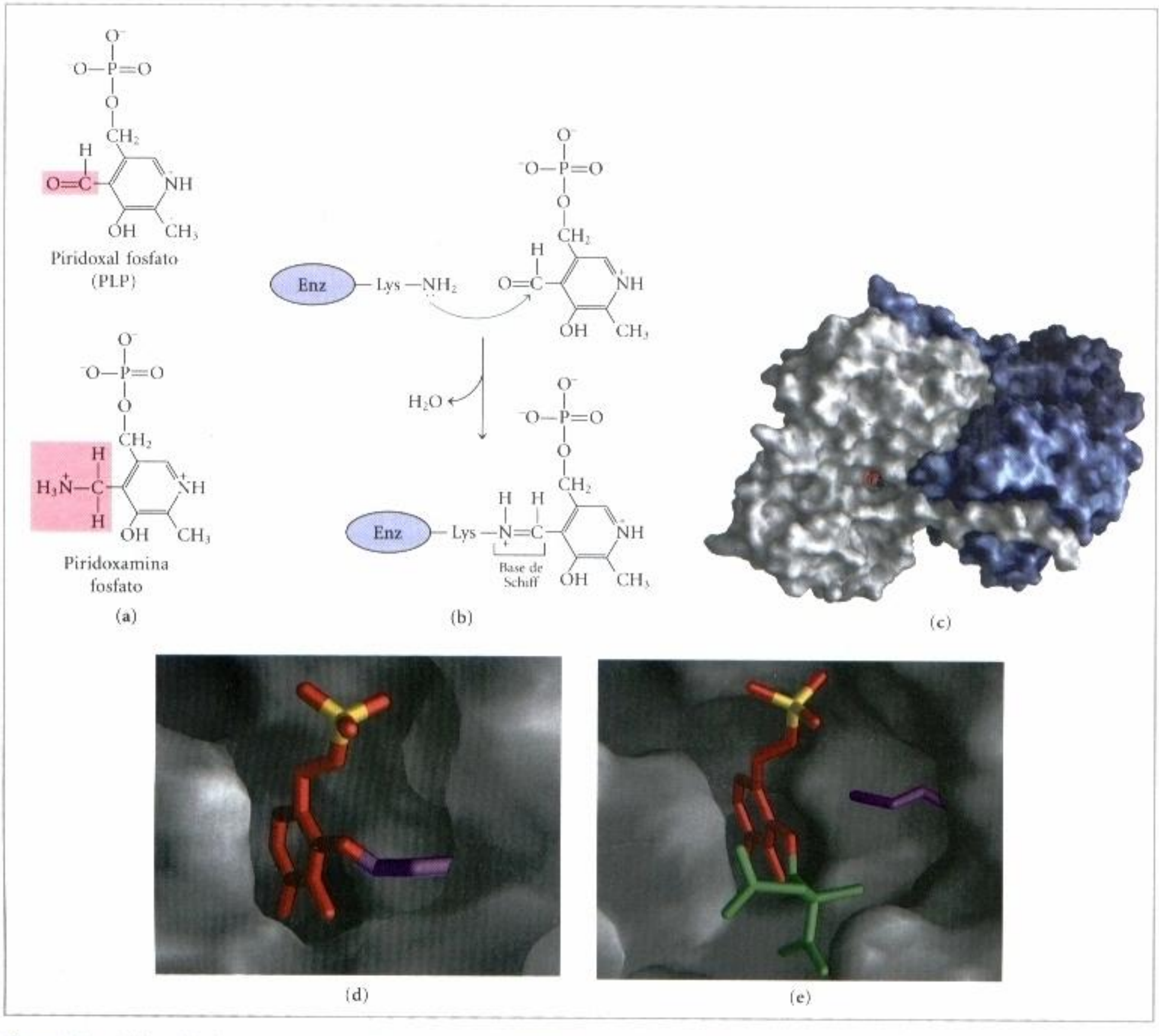


Figura 18-5 – Piridoxal fosfato, o grupo prostético das aminotransferases. (**a**) O piridoxal fosfato (PLP) e a sua forma aminada, a piridoxamina fosfato, são as coenzimas firmemente ligadas nas aminotransferases. Os grupos funcionais envolvidos em sua ação estão sombreados em vermelho. (**b**) O piridoxal fosfato está ligado à enzima por interações não-covalentes muito fortes e pela formação de uma base de Schiff, envolvendo um resíduo de lisina no sítio ativo. (**c**) PLP (vermelho) está mostrado ligado a um dos dois sítios ativos da aspartato aminotransferase, uma enzima dimérica e uma aminotransferase típica. (**d**) Uma visão próxima ao sítio ativo, com o PLP (em vermelho e com o fósforo em amarelo), fazendo uma ligação aldimina com a cadeia lateral da lisina^{258} (púrpura). (**e**) Outra visão próxima ao sítio ativo, com o PLP ligado ao análogo de substrato 2-metilaspartato (verde) por meio de uma base de Schiff.

se do glicogênio, entretanto sua participação, nessa reação, não é representativa da sua função normal de coenzima. Suas funções mais típicas ocorrem no metabolismo de moléculas com grupos amino.

O piridoxal fosfato funciona como um transportador intermediário de grupos amino no sítio ativo das aminotransferases. Ele sofre transformações reversíveis entre a sua forma aldeído, piridoxal fosfato, que pode aceitar um grupo amino, e a sua forma aminada, piridoxamina fosfato, que pode doar o seu grupo amino para um α-cetoácido (Fig. 18-5a). O piridoxal fosfato geralmente está covalentemente ligado ao sítio ativo da enzima, por meio de uma ligação imina (base de Schiff) ao grupo ε-amino de um resíduo de lisina (Fig. 18-5b, d).

O piridoxal está envolvido em uma grande variedade de reações nos carbonos α, β e γ (C-2 a C-4) dos aminoácidos. As reações no carbono α (Fig. 18-6) inclui, além das transaminações, racemizações (interconversões entre as formas D e L dos aminoácidos) e descarboxilações. Em cada uma dessas reações, o piridoxal fosfato desempenha sempre o mesmo papel químico. Uma das ligações ao carbono α é rompida, removendo-se um próton ou um grupo carboxila e deixando para trás um par de elétrons livres no carbono α (um carbânion). Esse intermediário é muito instável. O piridoxal fosfato fornece uma estrutura altamente conjugada (absorvedora de elétrons), que permite a deslocalização da carga negativa e a estabilização do carbânion.

As aminotransferases (Fig. 18-5c, d, e) são exemplos clássicos de enzimas que catalisam reações bimoleculares do tipo pingue-pongue (veja Fig. 8-13b). Em tais reações, o primeiro substrato precisa deixar o sítio ativo antes que o segundo substrato possa se ligar. Assim, o aminoácido que chega ao sítio ativo liga-se a ele, doa o seu grupo amino ao piridoxal fosfato e sai na forma de um α-cetoácido. A seguir o α-cetoácido que entra é ligado, aceita o agrupamento amino da piridoxamina fosfato e sai na forma de aminoácido.

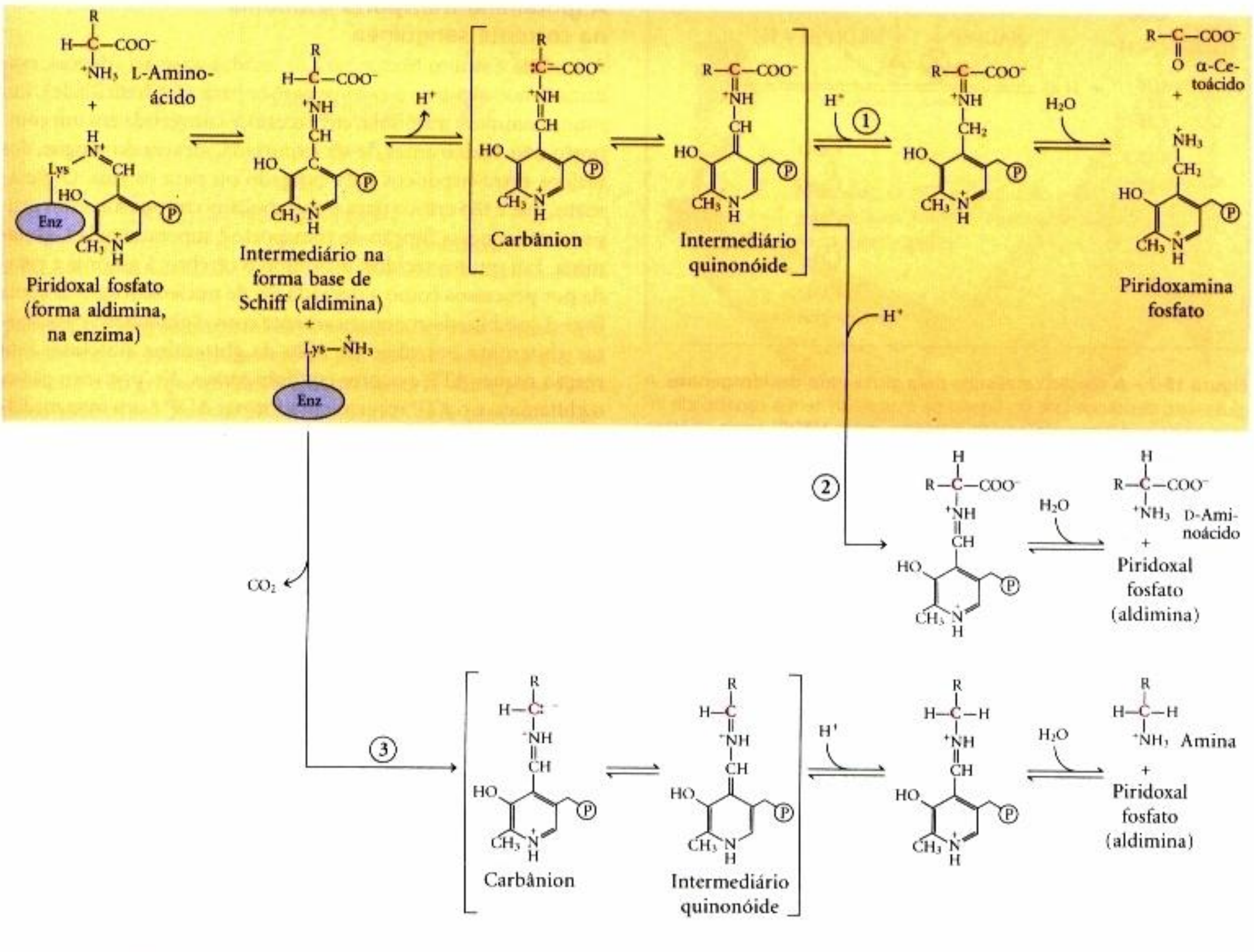


Figura 18-6 – Algumas das transformações no carbono α dos aminoácidos facilitadas pelo piridoxal fosfato. O piridoxal fosfato está ligado à enzima por meio de uma base de Schiff (veja Fig. 18-5b, d). As reações começam com a formação de uma nova base de Schiff (aldimina) entre o grupo α-amino do aminoácido e o PLP, a qual substitui a ligação enzima-PLP. O aminoácido pode então seguir três destinos alternativos, todos eles envolvendo a formação de um carbânion: ① transaminação, ② racemização ou ③ descarboxilação. A base de Schiff, formada entre o PLP e o aminoácido, é uma conjugação com o anel da piridina, que age como um escoadouro de elétrons, permitindo a deslocalização da carga negativa do carbânion (como mostrado entre colchetes). Um intermediário quinonóide está envolvido em todas as reações. A via de transaminação é especialmente importante nas vias descritas neste capítulo. A via de transaminação destacada (mostrada da esquerda para a direita) representa apenas parte da reação catalisada pelas aminotransferases. Para completar o processo, o segundo substrato, o α-cetoácido, substitui aquele que é liberado e é convertido em um aminoácido em uma reversão da reação (direita para a esquerda). O piridoxal fosfato também está envolvido em certas reações nos carbonos β e γ de alguns aminoácidos (não estão mostrados).

A determinação das concentrações da alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase no soro sangüíneo é um procedimento diagnóstico muito importante em Medicina (Adendo 18-1).

O glutamato libera amônia no fígado

Já vimos que, no fígado, os grupos amino são removidos de vários α-aminoácidos por transaminação com o α-cetoglutarato para formar L-glutamato. Como esses grupos amino são removidos do glutamato para prepará-los para a excreção?

Nos hepatócitos, o glutamato é transportado do citosol para o interior das mitocôndrias, onde sofre **desaminação oxidativa** catalisada pela **L-glutamato desidrogenase** (M_r 330.000). Essa enzima, que está presente apenas na matriz mitocondrial, requer NAD^+ ou $NADP^+$ como o receptor dos equivalentes redutores (Fig. 18-7). A ação combinada das aminotransferases e da glutamato desidrogenase é referida como uma **transdesaminação.** Alguns poucos aminoácidos contornam a via de transdesaminação e sofrem desaminação oxidativa direta. O destino dos NH_4^+, produzidos por qualquer desses processos, será discutido em detalhes mais adiante neste capítulo. O α-cetoglutarato, formado por desaminação do glutamato, pode ser empregado no ciclo do ácido cítrico e para a síntese de glicose.

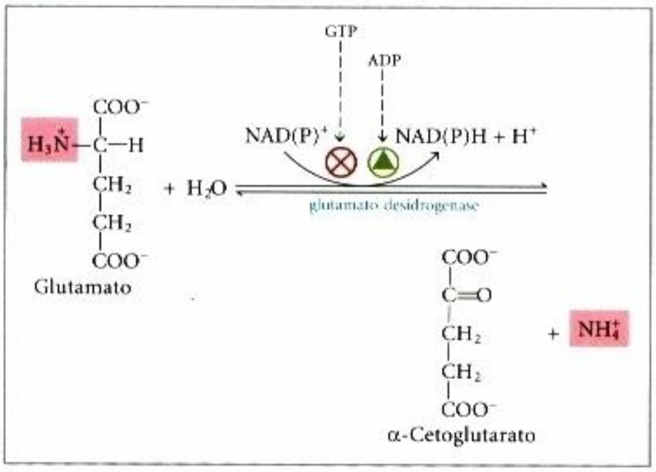


Figura 18-7 – A reação catalisada pela glutamato desidrogenase. A glutamato desidrogenase do fígado de mamíferos tem a capacidade incomum de poder empregar tanto o NAD^+ como o $NADP^+$ como co-fator. A glutamato desidrogenase dos vegetais e dos microrganismos são, em geral, específicas para um ou para outro. A enzima dos mamíferos é regulada alostericamente por ADP ou GTP.

A glutamato desidrogenase opera em uma importante interseção dos metabolismos do carbono e do nitrogênio. A molécula dessa enzima consiste em seis subunidades idênticas e sua atividade é fortemente influenciada por um conjunto complexo de efetores alostéricos. Destes, os mais bem estudados são o modulador positivo ADP e o GTP, um modulador negativo (Fig. 18-7). A razão metabólica para esse tipo de regulação não foi, ainda, elucidada em seus detalhes. Mutações que alteram o sítio alostérico de ligação do GTP provocam uma doença genética humana conhecida como síndrome da hiperinsulinemia-hiperamonêmia, caracterizada por níveis elevados de amônia no sangue associados à hipoglicemia.

A glutamina transporta a amônia na corrente sangüínea

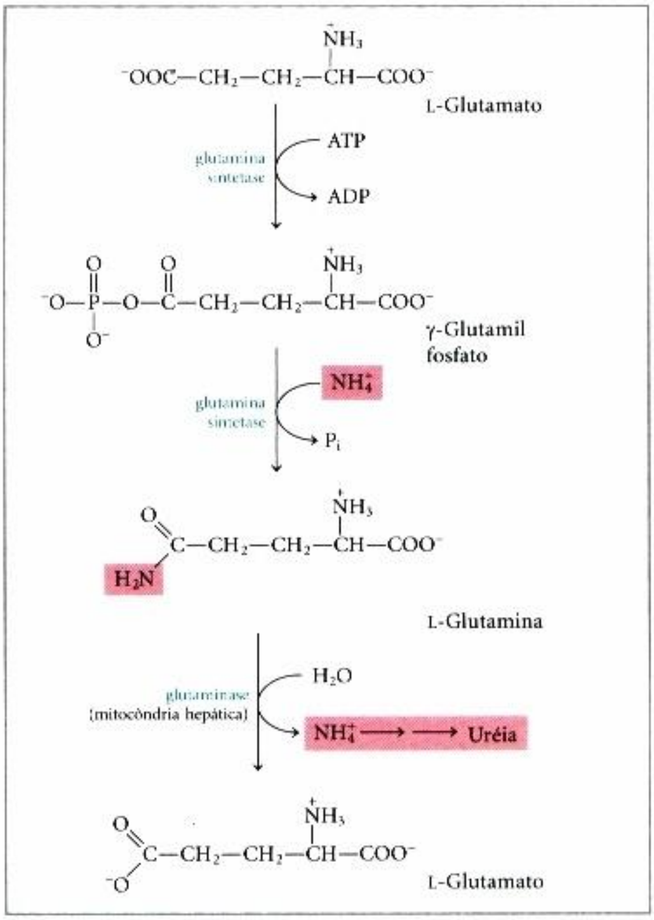
A amônia é muito tóxica para os tecidos animais (depois, examinaremos algumas possíveis razões para essa toxicidade). Em muitos animais, a amônia, em excesso, é convertida em um composto não-tóxico antes de ser exportada, através do sangue, dos tecidos extra-hepáticos para o fígado ou para os rins. O glutamato, que é tão crítico para o metabolismo intracelular dos grupos amino, nessa função de transporte é superado pela **L-glutamina.** Em muitos tecidos, incluindo o cérebro, a amônia é gerada por processos como a degradação de nucleotídeos. A amônia livre é combinada enzimaticamente com o glutamato para liberar glutamina por meio da ação da **glutamina sintetase.** Essa reação requer ATP e ocorre em dois passos. No primeiro passo, o glutamato e o ATP reagem para formar ADP e um intermediário, que é o γ-glutamil fosfato; este reage com a amônia para produzir glutamina e fosfato inorgânico. A glutamina é uma forma não-tóxica de transporte da amônia; normalmente, ela está

Adendo 18-1 Ensaios para o diagnóstico de lesões de tecidos

A análise de diferentes atividades enzimáticas no soro sangüíneo oferece informações valiosas para o diagnóstico de uma série de condições mórbidas.

A alanina aminotransferase (ALT; também chamada glutamato-piruvato transaminase, GPT) e a aspartato aminotransferase (AST; também chamada glutamato-oxaloacetato transaminase, GOT) são importantes no diagnóstico de lesões hepáticas e cardíacas provocadas por infarto do miocárdio, drogas tóxicas ou infecções. Após o infarto do miocárdio, várias enzimas, incluindo essas aminotransferases, vazam das células lesadas e passam para a corrente sangüínea. A determinação da concentração no soro sangüíneo de duas aminotransferases pelos testes de SGPT e SGOT (S simboliza soro) e de uma outra enzima cardíaca, a **creatina quinase** (o teste SCK), pode fornecer informações a respeito da severidade e do estágio da lesão no coração. Após um ataque cardíaco, a creatina quinase é a primeira enzima a aparecer no sangue e, também, a desaparecer rapidamente. A GOT é a próxima enzima a aparecer e, pouco depois, aparece a GTP. A lactato desidrogenase também escapa do músculo cardíaco injuriado ou anaeróbico.

As determinações de SGOT e SGTP são também importantes na medicina industrial para determinar se as pessoas expostas ao tetracloreto de carbono, ao clorofórmio ou a outros solventes empregados nas indústrias químicas, de limpeza a seco e outras, apresentam lesão hepática. Esses solventes provocam a degeneração hepática, com extravasamento na corrente sangüínea de várias enzimas das células hepáticas lesadas. As transaminases, muito ativas no fígado e cuja atividade pode ser detectada em quantidades muito pequenas, são muito úteis na monitorização do soro sangüíneo de pessoas expostas a riscos nessas indústrias químicas.


L-Glutamato
glutamina sintetase
ATP
ADP
γ-Glutamil fosfato
glutamina sintetase
NH_4^+
P_i
H_2N
L-Glutamina
glutaminase (mitocôndria hepática)
H_2O
NH_4^+ ⟶ ⟶ Uréia
L-Glutamato

presente no sangue humano em concentração muito maior que aquelas dos demais aminoácidos. Em adição ao seu papel no transporte do grupo amino, a glutamina serve como uma fonte desses grupos em uma variedade muito grande de processos biossintéticos. A glutamina sintetase é encontrada em todos organismos, sempre desempenhando um papel metabólico central. Nos microrganismos, a enzima serve como um portal essencial para a entrada do nitrogênio fixado por sistemas biológicos. (Os papéis da glutamina e da glutamina sintetase, no metabolismo, serão discutidos no Capítulo 22.)

Nos tecidos da maioria dos animais terrestres, a glutamina, excedendo à quantidade necessária para as reações biossintéticas, é transportada pelo sangue para o fígado e para o rim, para processamento. O nitrogênio do grupo amida é liberado como amônia apenas nas mitocôndrias do fígado e do rim, onde a enzima **glutaminase** converte a glutamina em glutamato e NH_4^+. No fígado, essa reação fornece outra fonte de amônia para ser eliminada por meio da produção de uréia. O glutamato é trabalhado pela glutamato desidrogenase, liberando mais amônia e produzindo esqueletos carbônicos, que serão utilizados como combustível metabólico.

Em condições normais, os rins extraem pouca glutamina do sangue, mas, quando o organismo está em acidose metabólica, eles aumentam essa quantidade. O NH_4^+, produzido nos rins pela ação da glutaminase e da glutamato desidrogenase, não é passado para a corrente sangüínea ou transformado em uréia, mas excretado diretamente na urina. No rim, o NH_4^+ forma sais com os ácidos metabólicos e, assim, favorece sua remoção por meio da urina. A descarboxilação do α-cetoglutarato, no ciclo do ácido cítrico, fornece o bicarbonato que pode servir como tampão no plasma sangüíneo. Juntos, esses efeitos do metabolismo da glutamina no rim tendem a corrigir a acidose.

A alanina transporta amônia dos músculos para o fígado

A alanina também desempenha um papel especial no transporte para o fígado dos grupos amino em uma forma não-tóxica, por meio do **ciclo da glicose-alanina** (Fig. 18-8). No músculo e em certos tecidos que degradam os aminoácidos para empregá-los como combustível, os grupos amino são coletados por transaminação na forma de glutamato (veja Fig. 18-2). O glutamato pode, então, ser convertido em glutamina para ser transportado até o fígado ou transferir o seu grupo a-amino para o piruvato, um produto da glicólise muscular facilmente disponível, pela ação da **alanina aminotransferase** (Fig. 18-8). A alanina formada passa para o sangue e viaja até o fígado. No citosol dos hepatócitos, a alanina aminotransferase transfere o grupo amino da alanina para o a-cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. Este pode entrar na mitocôndria onde a reação da glutamato desidrogenase libera o NH_4^+ (Fig. 18-7) ou pode sofrer transaminação com o oxaloacetato para formar aspartato, outro doador de nitrogênio para a síntese de uréia.

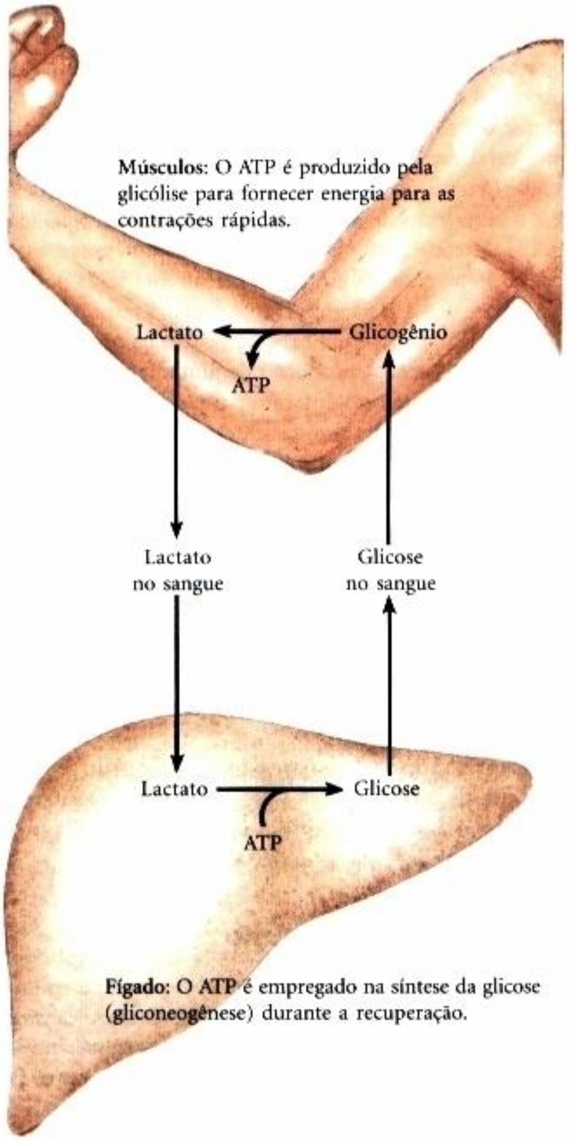

Músculos: O ATP é produzido pela glicólise para fornecer energia para as contrações rápidas.
Lactato
Glicogênio
ATP
Lactato no sangue
Glicose no sangue
Lactato
Glicose
ATP
Fígado: O ATP é empregado na síntese da glicose (gliconeogênese) durante a recuperação.

Figura 18-8 – O ciclo glicose-alanina. A alanina funciona como um transportador da amônia e do esqueleto carbônico do piruvato desde o músculo até o fígado. A amônia é excretada, e o piruvato é empregado na produção de glicose, a qual pode retornar ao músculo.

O emprego da alanina para transportar amônia dos músculos esqueléticos para o fígado é outro exemplo da economia intrínseca dos organismos vivos. Os músculos esqueléticos em contração vigorosa operam em anaerobiose, produzindo não apenas amônia da quebra de proteínas, mas também grandes quantidades de piruvato e lactato da glicólise. Esses produtos precisam encontrar um caminho para o fígado — a amônia, para ser convertida em uréia que será excretada; e o piruvato, para ser reformado em moléculas de glicose e, nessa forma, retornar até os músculos. O ciclo glicose-alanina, em conjunto com o ciclo de Cori (veja Adendo 15-1 e Fig. 23-6), cumpre essa tarefa. Dessa maneira, a carga energética da gliconeogênese é imposta sobre o fígado e não sobre o músculo, de tal forma que todo o ATP disponível no músculo pode ser destinado à contração muscular.

A amônia é tóxica para os animais

A produção catabólica da amônia coloca um sério problema bioquímico, porque ela é muito tóxica. As bases moleculares dessa toxicidade não são inteiramente compreendidas. Nas pessoas, os estágios terminais da intoxicação por amônia são caracterizados pelo estabelecimento de um estado comatoso e de outros efeitos sobre o cérebro, de tal forma que muitas pesquisas e especulações sobre o tema têm sido centradas no tecido cerebral. As especulações são baseadas, principalmente, em uma depleção potencial do ATP em células cerebrais.

Livrar o citosol do excesso de amônia requer a aminação redutiva do α-cetoglutarato em glutamato pela glutamato desidrogenase (a reversão da reação descrita anteriormente; veja Fig. 18-7) e a conversão do glutamato em glutamina pela ação da glutamina sintetase. Ambas as enzimas estão presentes em grande concentração no cérebro, embora a reação catalisada pela glutamina sintetase seja a mais importante via para remoção da amônia. Uma mudança no equilíbrio da reação da glutamato desidrogenase em direção à produção de glutamato pode limitar a disponibilidade do α-cetoglutarato para o ciclo do ácido cítrico e, assim, a reação da glutamina sintetase reduzirá os níveis de ATP. Acima de tudo, concentrações tóxicas de NH_4^+ podem interferir com os altos níveis de produção de ATP necessários para a manutenção das funções cerebrais.

A retirada do glutamato, por meio da reação da glutamina sintetase, pode ter efeitos adicionais sobre o cérebro. O glutamato e seu derivado, o γ-aminobutirato (GABA; veja Fig. 22-27), são neurotransmissores importantes; a sensibilidade do cérebro à amônia pode refletir uma diminuição desses neurotransmissores, bem como variações no metabolismo celular do ATP.

Para concluir esta discussão sobre o metabolismo do grupo amino, note que descrevemos vários processos que depositam o excesso de amônia na mitocôndria dos hepatócitos (Fig. 18-2). Vamos agora estudar o destino dessa amônia.

A Excreção do Nitrogênio e o Ciclo da Uréia

Quando não são empregados para a síntese de novos aminoácidos ou de outros compostos nitrogenados, os grupos amino são destinados à formação de um único produto final, a uréia (Fig. 18-9). As espécies aquáticas, na maioria, como a dos peixes ósseos, excretam o nitrogênio do grupo amino como amônia e, por isso, são chamados de animais **amoniotélicos**; os animais terrestres, na maioria, excretam o nitrogênio do grupo amino na forma de uréia e são, assim, **ureotélicos**; os pássaros e os répteis excretam o nitrogênio amino como ácido úrico e são chamados **uricotélicos**. (A via de síntese do ácido úrico está descrita na Fig. 22-43.) Os vegetais reciclam praticamente todos os seus grupos amino, e a excreção de nitrogênio ocorre apenas em circunstâncias muito incomuns.

Nos organismos ureotélicos, a amônia é convertida em uréia, nas mitocôndrias dos hepatócitos, por meio do **ciclo da uréia**. Essa via foi descoberta, em 1932, por Hans Krebs (que depois também descobriria o ciclo do ácido cítrico) e por um pesquisador associado, Kurt Henseleit, que, na época, ainda era estudante de medicina. A produção de uréia ocorre quase exclusivamente no fígado e representa o destino da maior parte da amônia canalizada para esse órgão. Dos hepatócitos, a uréia passa para o sangue, que a transporta até os rins, onde é excretada na urina. Estudaremos, agora, a produção da uréia.

A uréia é produzida da amônia em cinco passos enzimáticos

O ciclo da uréia começa no interior da mitocôndria do fígado, mas três dos passos subseqüentes ocorrem no citosol; assim, o ciclo abrange dois compartimentos celulares (Fig. 18-9). O primeiro grupo amino que entra no ciclo é derivado da amônia, originada na matriz mitocondrial por processos descritos anteriormente. O fígado também recebe alguma amônia que chega através da veia porta e é produzida por oxidação de aminoácidos pela flora bacteriana intestinal. Qualquer que seja sua origem, a amônia, presente no interior da matriz das mitocôndrias hepáticas, é, imediatamente, reunida com o CO_2 (na forma de bicarbonato, HCO_3^-) produzido pelo ciclo de Krebs para formar o carbamil fosfato (Fig. 18-10; veja também Fig. 18-9). Essa reação é dependente de ATP e catalisada pela **carbamil fosfato sintetase I**, uma enzima regulatória (veja adiante). A forma mitocondrial dessa enzima é diferente da forma citosólica (II), que tem função separada na biossíntese da pirimidina (Capítulo 22).

O carbamil fosfato pode ser visto como um doador ativado do grupo carbamil e, agora, entra no ciclo da uréia. Esse ciclo tem quatro passos enzimáticos. No primeiro, a ornitina recebe o grupo carbamil do carbamil fosfato e forma a citrulina, com a liberação de P_i (Fig. 18-9, passo ①). A ornitina desempenha um papel semelhante àquele do oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico, recebendo material a cada volta do ciclo. Essa reação é catalisada pela **ornitina transcarbamilase**, e a citrulina resultante passa para o citosol.

Um segundo grupo amino, originado do aspartato (gerado na mitocôndria por transaminação e transportado para o citosol), é adicionado à citrulina por uma reação de condensação entre o grupo amino do aspartato e o grupo ureído (carbomil) da citrulina, formando o argininossuccinato (passo ②). Essa reação ocorre no citosol, catalisada pela **argininossuccinato sintase**, consome ATP e processa-se por meio de um intermediário citrulil-AMP. O argininossuccinato é rompido por uma **argininossuccinato liase** (passo ③), liberando arginina e fumarato, este último entra no conjunto mitocondrial de intermediários do ciclo do ácido cítrico. No último passo do ciclo da uréia (passo ④), a enzima citosólica **arginase** hidrolisa a arginina em ornitina e **uréia**. A ornitina é transportada para o interior da mitocôndria para iniciar uma nova volta do ciclo da uréia.

Como estudamos no Capítulo 15, as enzimas de muitas vias metabólicas são agrupadas (pág. 418), e o produto de uma reação enzimática é passado diretamente para o sítio ativo da enzima seguinte da via. No ciclo da uréia, as enzimas citosólicas e mitocondriais parecem estar agrupadas dessa maneira. A citrulina, transportada para o citosol, não é diluída na solução geral de metabólitos ali existentes, mas passa diretamente para o sítio ativo da

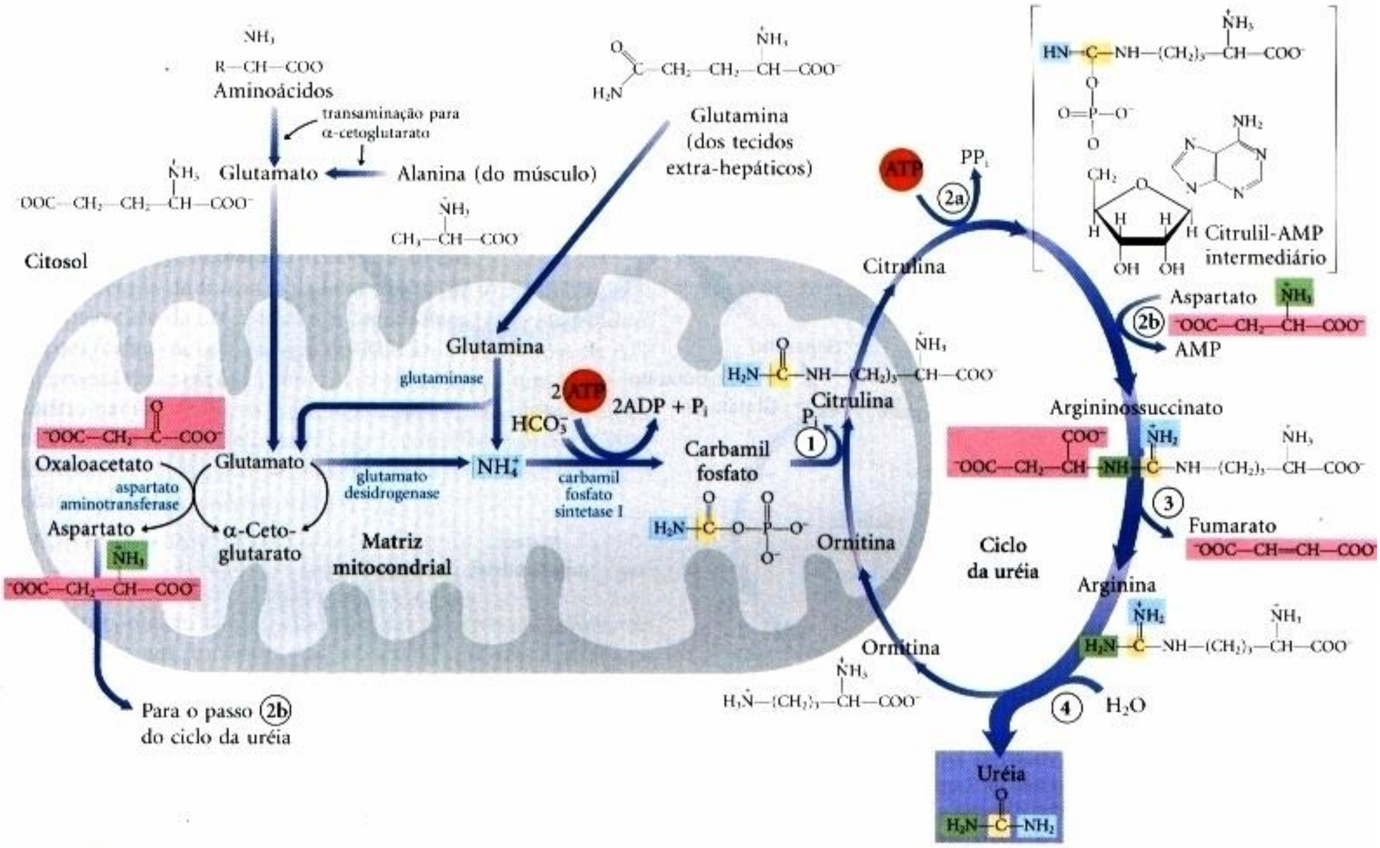

Aminoácidos
transaminação para α-cetoglutarato
Glutamato
Alanina (do músculo)
Glutamina (dos tecidos extra-hepáticos)
Citosol
Glutamina
glutaminase
Oxaloacetato
Glutamato
aspartato aminotransferase
Aspartato
α-Cetoglutarato
glutamato desidrogenase
NH_4^+
2 ATP
HCO_3^-
2ADP + P_i
carbamil fosfato sintetase I
Carbamil fosfato
Matriz mitocondrial
Citrulina
Ornitina
Ciclo da uréia
ATP
PP_i
2a
2b
Citrulil-AMP intermediário
Aspartato
AMP
Argininossuccinato
3
Fumarato
Arginina
4
H_2O
Uréia
Para o passo 2b do ciclo da uréia

Figura 18-9 – O ciclo da uréia e as reações que nele introduzem os grupos amino. Note que as enzimas que catalisam estas reações (citadas no texto) estão distribuídas entre a matriz mitocondrial e o citosol. Um grupo amino entra no ciclo da uréia a partir do carbamil fosfato (passo ①) formado na matriz; o outro (que entra no passo ⓶ⓑ) é derivado do aspartato, também formado na matriz por meio da transaminação do oxaloacetato com o glutamato em uma reação catalisada pela aspartato aminotransferase. Em si mesmo, o ciclo da uréia consiste de quatro passos: ① Formação da citrulina a partir de ornitina e carbamil fosfato; a citrulina passa para o citosol. ② Formação de argininossuccinato por meio de um intermediário citrulil-AMP. ③ Formação de arginina a partir do argininossuccinato. Essa reação libera fumarato, que entra no ciclo do ácido cítrico. ④ Formação da uréia. A reação da arginase também regenera o composto inicial do ciclo, a ornitina. As vias pelas quais o NH_4^+ chega à matriz mitocondrial estão discutidas no texto.

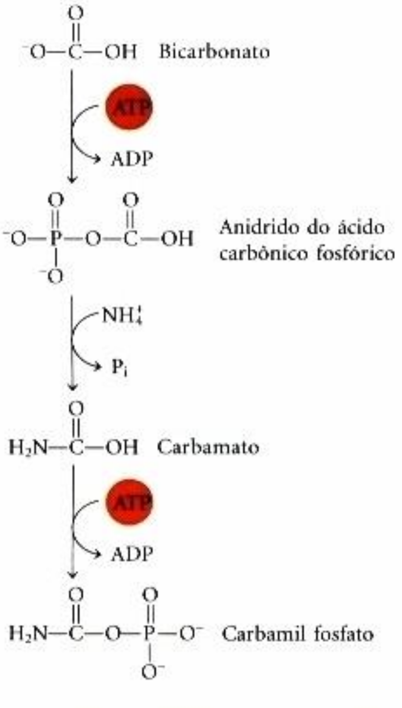

Bicarbonato
ATP
ADP
Anidrido do ácido carbônico fosfórico
NH_4^+
P_i
Carbamato
ATP
ADP
Carbamil fosfato

Figura 18-10 – A reação catalisada pela carbamil fosfato sintetase I. Os grupos terminais de duas moléculas de ATP são empregados para formar uma molécula de carbamil fosfato. Em outras palavras, essa reação tem dois passos de ativação.

argininossuccinato sintetase. Esse direcionamento entre enzimas continua para o argininossuccinato, a arginina e a ornitina. Apenas a uréia é liberada no conjunto geral de metabólitos citosólicos.

O ciclo do ácido cítrico e o ciclo da uréia podem ser unidos

O fumarato, produzido na reação da argininossuccinato liase, é também um intermediário do ciclo do ácido cítrico, assim, em princípio, os ciclos são interconectados em um processo dito "biciclo ou bicicleta de Krebs" (Fig. 18-11). Entretanto, cada ciclo pode funcionar de forma independente, e a comunicação entre eles depende do transporte de intermediários-chave entre o interior da mitocôndria e o citosol. Várias enzimas do ciclo do ácido cítrico, incluindo a fumarase (fumarato hidratase) e a malato desidrogenase (pág. 450), também ocorrem como isozimas no citosol. O fumarato, gerado na síntese citosólica da arginina, pode ser convertido em malato; e este, em oxaloacetato no citosol; esses intermediários podem sofrer metabolização no próprio citosol ou ser transportados para o interior da mitocôndria para uso no ciclo do ácido cítrico.

O aspartato, formado na mitocôndria por transaminação entre o oxaloacetato e o glutamato, pode ser transportado para o citosol, onde serve como doador de nitrogênio na reação do ciclo da uréia catalisado pela argininossuccinato sintetase. Essas reações fazem o **desvio aspartato-argininossuccinato**, provêm as ligações metabólicas entre as vias separadas por meio das quais os grupos amino e os esqueletos carbônicos dos aminoácidos são processados.

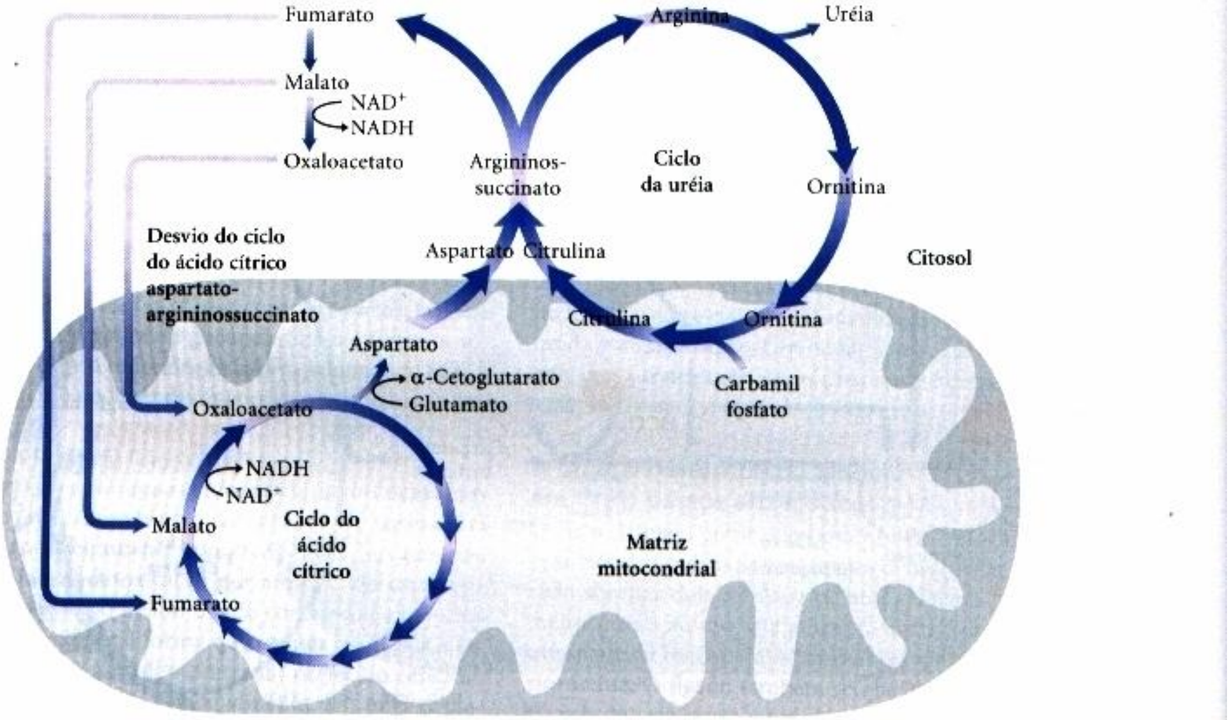

Fumarato
Malato
NAD⁺
NADH
Oxaloacetato
Arginina
Uréia
Argininos-succinato
Ciclo da uréia
Ornitina
Citosol
Desvio do ciclo do ácido cítrico aspartato-argininossuccinato
Aspartato
Citrulina
Citrulina
Ornitina
Aspartato
α-Cetoglutarato
Glutamato
Carbamil fosfato
Oxaloacetato
NADH
NAD⁺
Malato
Ciclo do ácido cítrico
Matriz mitocondrial
Fumarato

Figura 18-11 – Interconexões entre o ciclo da uréia e o ciclo do ácido cítrico. As vias que se interconectam no alto da figura são chamadas de "bicicleta de Krebs". Quando o ciclo do ácido cítrico é incluído, também se emprega o nome "triciclo de Krebs". O ciclo que une os ciclos da uréia e do ácido cítrico é chamado de "desvio aspartato-argininossuccinato". Essas vias unem efetivamente os destinos dos grupos amino e dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos. As interconexões são ainda mais elaboradas que o sugerido pelas setas. Por exemplo, algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico, como a malato desidrogenase e a furamase, têm isoenzimas citosólicas e mitocondriais. O furamato produzido no citosol — pelo ciclo da uréia, biossíntese de purinas ou outros processos — pode ser convertido em malato e oxaloacetato citosólicos, estes podem ser utilizados no próprio citosol. O oxaloacetato é o precursor da glicose (veja Fig. 20-5) e de alguns aminoácidos (vela Fig. 22-9). De forma alternativa, o malato e o oxaloacetato citosólicos podem ser transportados para a mitocôndria e utilizados no ciclo do ácido cítrico. O transporte do malato para a mitocôndria é bem conhecido e é parte da lançadeira malato-aspartato descrita na Figura 19-26.

A atividade do ciclo da uréia é regulada em dois níveis

O fluxo de nitrogênio por meio do ciclo da uréia varia com a composição dos nutrientes presentes na alimentação. Quando a dieta é principalmente protéica, o uso dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos como combustível resulta na produção de muita uréia a partir dos grupos amino excedentes. Pela mesma razão, durante a desnutrição severa, quando a quebra de proteínas musculares fornece a maior parte do combustível metabólico, a produção de uréia também aumenta substancialmente.

A longo prazo, essas variações na demanda de atividade do ciclo da uréia são enfrentadas pela regulação das velocidades de síntese das quatro enzimas do ciclo da uréia e da carbamil fosfato sintetase I no fígado. Todas as cinco enzimas são sintetizadas em velocidade maior, quer em animais submetidos à desnutrição, quer em animais submetidos a dietas de conteúdo protéico muito alto, quando comparamos estes a animais bem alimentados e com dietas contendo principalmente gorduras e carboidratos. Os animais colocados em dietas destituídas de proteínas produzem níveis ainda menores das enzimas do ciclo da uréia.

Em uma escala de tempo menor, o ajuste do fluxo por meio do ciclo da uréia envolve a regulação alostérica de, pelo menos, uma enzima. A primeira enzima na via, a carbamil fosfato sintetase I, é ativada alostericamente por *N*-**acetilglutamato**, que é sintetizado de acetil-CoA e glutamato (Fig. 18-12) pela *N*-**acetilglutamato sintase**; nos microrganismos e nos vegetais, essa enzima catalisa o primeiro passo da síntese "de novo" da arginina

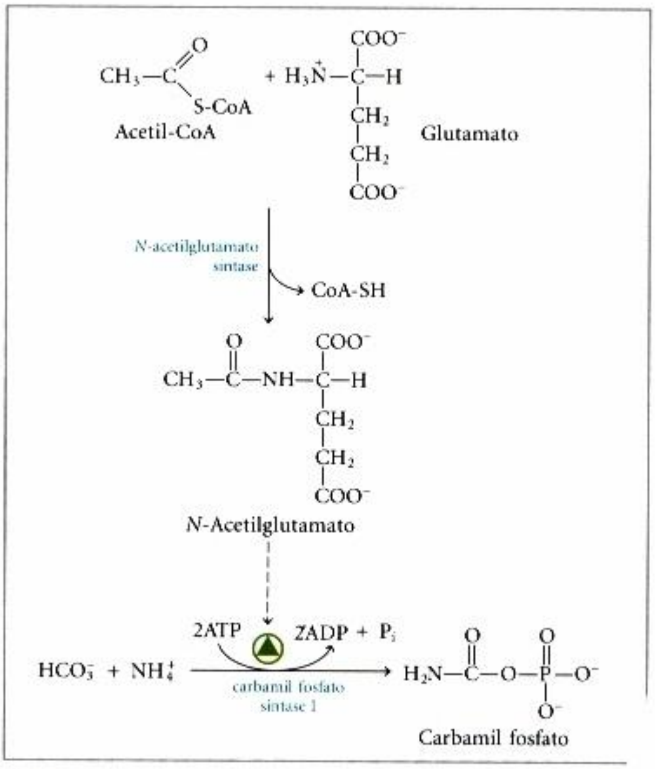

Acetil-CoA
Glutamato
N-acetilglutamato sintase
CoA-SH
N-Acetilglutamato
2ATP
2ADP + Pᵢ
HCO₃⁻ + NH₄⁺
carbamil fosfato sintase I
Carbamil fosfato

Figura 18-12 – A síntese do *N*-acetilglutamato e sua ativação da carb mil fosfato sintetase I.

a partir de glutamato (veja Fig. 22-10). Os mamíferos, entretanto, apesar de possuírem no fígado a *N*-acetilglutamato sintase, não possuem as demais enzimas necessárias para a conversão do glutamato em arginina. Assim, é enigmático o emprego pelos mamíferos do *N*-acetilglutamato para ativar um passo do ciclo da uréia.

Interconexões entre as vias reduzem o custo energético da síntese da uréia

Se considerada de forma isolada, a síntese de uma molécula de uréia pelo ciclo da uréia gasta a energia correspondente a quatro ligações fosfato de alta energia do ATP. Duas moléculas de ATP são necessárias para fazer um carbamil fosfato, e um ATP é necessário para sintetizar o argininossuccinato. Na última reação, entretanto, o ATP sofre uma clivagem com liberação de AMP e pirofosfato, o qual pode ser hidrolisado para liberar dois P_i. A equação global do ciclo da uréia é

$$2NH_4^+ + HCO_3^- + 3ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow \text{uréia} + 2ADP^{3-} + 4P_i^{2-} + AMP^{2-} + 5H^+$$

Entretanto, o ciclo da uréia também faz a conversão líquida do oxaloacetato em fumarato (via aspartato), e a regeneração do oxaloacetato (Fig. 18-11) produz NADH na reação catalisada pela malato desidrogenase. Cada molécula do NADH pode gerar até 2,5 ATPs durante a respiração mitocondrial (Capítulo 19), reduzindo muito o custo energético global da síntese de uréia.

Defeitos genéticos no ciclo da uréia podem ameaçar a vida de seus portadores

Pessoas com defeitos genéticos em qualquer das enzimas envolvidas na formação de uréia podem ser intolerantes a dietas ricas em proteínas. Os aminoácidos ingeridos em excesso, diante do mínimo diário necessário para a biossíntese de proteínas, são desaminados no fígado, e a amônia livre resultante não poderá ser, nessas pessoas, convertida em uréia e esta transferida para o sangue, isso resulta em acúmulo da amônia que, como já vimos, é altamente tóxica. Entretanto, os seres humanos não podem viver por longos períodos submetidos a uma dieta livre de proteínas. Somos incapazes de sintetizar metade dos 20 aminoácidos-padrão e os dez **aminoácidos essenciais** (Tabela 18-1) precisam ser fornecidos pela alimentação.

Tabela 18-1 – Aminoácidos essenciais e não-essenciais para o homem e para o rato albino

Não-essenciais	Essenciais
Alanina	Arginina*
Asparagina	Histidina
Aspartato	Isoleucina
Cisteína	Leucina
Glutamato	Lisina
Glutamina	Metionina
Glicina	Fenilalanina
Prolina	Treonina
Serina	Triptofano
Tirosina	Valina

*Essencial para indivíduos jovens e em crescimento, mas não para adultos.

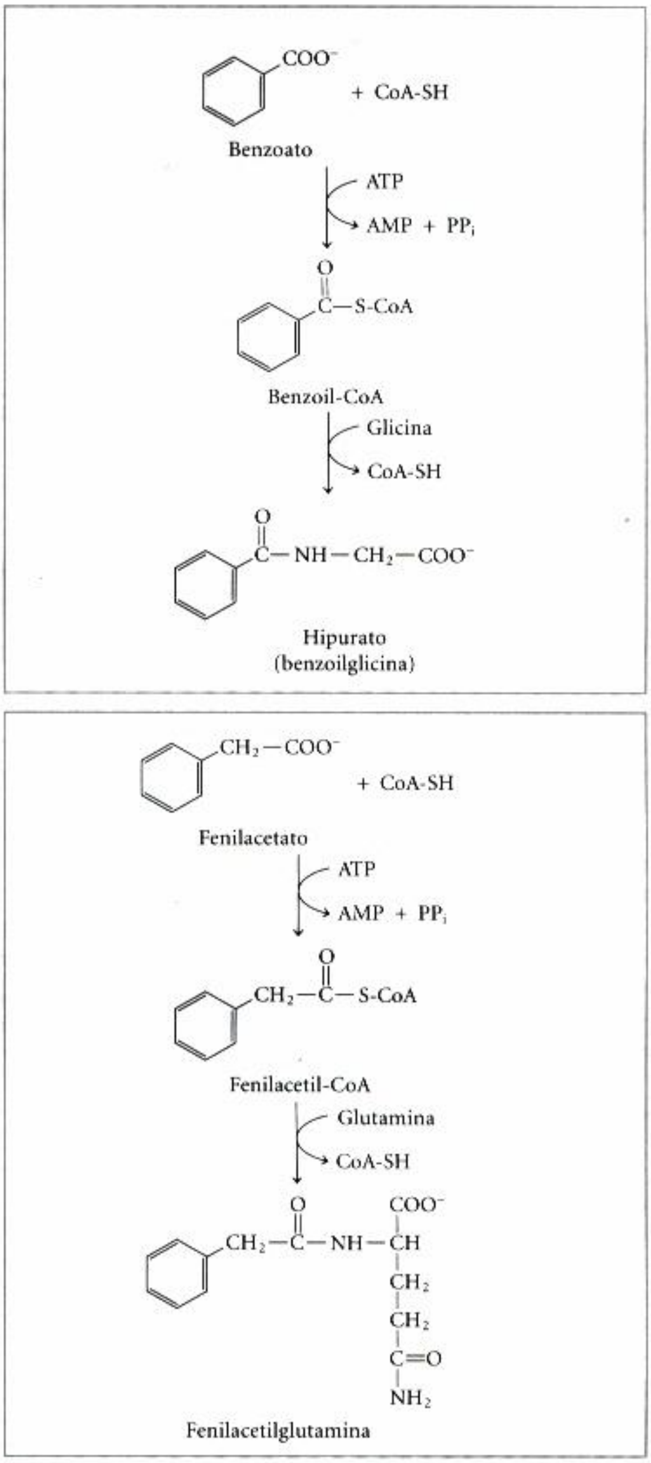
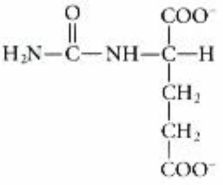


Figura 18-13 – Tratamento para deficiências de enzimas do ciclo da uréia. Os ácidos benzóico e fenilacético têm caráter químico aromático e, quando administrados na dieta, combinam com a glicina e a glutamina, respectivamente; os produtos dessa combinação são excretados na urina. A síntese subseqüente de glicina e glutamina para repor o conjunto desses intermediários remove a amônia da corrente sangüínea.

Várias terapias são empregadas no tratamento de pessoas com defeitos genéticos do ciclo da uréia. A criteriosa administração alimentar dos ácidos aromáticos, benzoato e fenilacetato, podem ajudar a baixar os níveis de amônia no sangue (Fig. 18-13). O benzoato é convertido em benzoil-CoA, que se combina com a glicina para formar hipurato. A glicina, empregada nesse processo, precisa ser regenerada e, assim, a amônia é consumida na reação da glicina sintase (Capítulo 22). O fenilacetato combina com a glutamina para formar fenilacetilglutamina, favorecendo a síntese aumentada da glutamina pela glutamina sintetase (veja Equação 22-1) e ajudando a remover a amônia. O hipurato e a fenilacetilglutamina são ambos compostos atóxicos e excretados na urina. Embora as vias mostradas na Figura 18-13 façam apenas pequenas contribuições para o metabolismo normal, elas se tornam proeminentes quando os ácidos aromáticos são ingeridos.

Outras terapias são mais específicas para a alteração de uma dada enzima. A deficiência da *N*-acetilglutamato sintase resulta na ausência do ativador normal da carbamil fosfato sintetase I (Fig. 18-12). Essa condição pode ser tratada pela administração de carbamil glutamato, um análogo do *N*-acetilglutamato que age na ativação da carbamil fosfato sintetase I. Adicionar arginina à alimentação é benéfico no tratamento da deficiência da ornitina transcarbamilase, da argininossuccinato sintetase e da argininossuccinato liase. Muitos desses tratamentos precisam ser acompanhados por controle alimentar estrito e suplementação de aminoácidos essenciais. Nos raros casos em que a arginase é deficiente, a arginina, o substrato dessa enzima, precisa ser excluída da dieta.



$H_2N-C(=O)-NH-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-COO^-$

Carbamil glutamato

O habitat determina a via de excreção do nitrogênio

A síntese da uréia não é a única nem mesmo a mais comum das vias de excreção da amônia. A base para uma forma molecular particular pela qual os grupos amino são excretados repousa na relação entre a anatomia e a fisiologia do organismo e seu habitat. Bactérias e protozoários de vida livre simplesmente liberam a amônia para o meio aquoso, no qual ela é diluída, e, assim, tornada enódoa. Nos peixes ósseos (animais amoniotélicos), o fígado é o sítio primário do catabolismo dos aminoácidos. O NH_4^+ produzido por transdesaminação é simplesmente liberado do fígado na corrente sangüínea para ser transportado até as guelras, das quais ele é carregado de forma rápida pela água que passa através delas. Assim, os peixes ósseos não precisam de um sistema urinário complexo.

Nos pássaros e répteis, a disponibilidade de água para o processo de excreção é de consideração especial e importante. A excreção da uréia diluída na urina requer a excreção simultânea de volumes de água relativamente grandes; os pássaros seriam impedidos de voar pelo peso dessa massa extra de água, e os répteis que vivem em ambientes áridos não conseguiriam economizar água. Esses animais convertem o nitrogênio do grupo amino em purinas e estas são catabolizadas em ácido úrico, uma substância relativamente insolúvel que é excretada junto com as fezes como uma massa semi-sólida de cristais de ácido úrico (veja pág. 486). Para obter a vantagem de excretar o nitrogênio do grupo amino nessa forma, pássaros e répteis realizam um trabalho metabólico considerável; a via que leva o nitrogênio dos aminoácidos até as purinas e ao ácido úrico é um processo complexo e consumidor de energia (Capítulo 22).

Vias de Degradação dos Aminoácidos

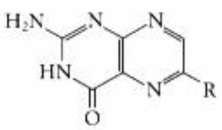
O conjunto das vias catabólicas dos aminoácidos nos humanos correspondem, normalmente, a apenas 10% a 15% da produção de energia corpórea; portanto, estas vias não têm uma atividade próxima daquela da glicólise e da oxidação dos ácidos graxos. O fluxo através dessas vias também varia de forma considerável, dependendo do equilíbrio entre as necessidades para os processos biossintéticos e as quantidades disponíveis de um dado aminoácido. As 20 vias catabólicas convergem para formar apenas cinco produtos, todos eles entram no ciclo do ácido cítrico (Fig. 18-14). Daí, os carbonos podem ser conduzidos para a gliconeogênese ou para a cetogênese, ou podem ser completamente oxidados até CO_2 e H_2O.

Apenas parte ou a totalidade dos esqueletos carbônicos de 10 dos aminoácidos são, em última instância, quebrados para liberar acetil-CoA. Cinco aminoácidos são convertidos em α-cetoglutarato, quatro em succinil-CoA, dois em fumarato e dois em oxaloacetato. As vias individuais para os 20 aminoácidos serão sumariadas por meio de diagrama de fluxo, cada uma levando a um ponto específico de entrada no ciclo do ácido cítrico. Nesses diagramas, os átomos de carbono dos aminoácidos que entram no ciclo do ácido cítrico são mostrados em cores. Note que alguns aminoácidos aparecem mais que uma vez, refletindo o fato de diferentes partes dos seus esqueletos carbônicos terem destinos diferentes. Nessas vias, algumas das reações enzimáticas são particularmente notáveis por seus mecanismos, e seus significados médicos serão separados para uma discussão especial.

Vários co-fatores enzimáticos desempenham papéis importantes no catabolismo dos aminoácidos

Uma grande variedade de rearranjos químicos interessantes é encontrada entre as vias catabólicas dos aminoácidos. Antes de examinar as vias em si mesmas, é útil estudar as classes de reações que ocorrem e introduzir os co-fatores enzimáticos a elas necessários. Já estudamos uma classe importante, as reações de transaminação que empregam o piridoxal fosfato. Outro tipo comum de reação no catabolismo dos aminoácidos é a transferência de unidades de um carbono, ou unidades monocarbônicas. A transferência dessas unidades, em geral, envolve um dos três co-fatores seguintes: biotina, tetraidrofolato e *S*-adenosil-metionina (Fig. 18-15). Esses co-fatores são empregados para transferir as unidades monocarbônicas em diferentes estados de oxidação: o CO_2 representa o estado de maior oxidação do carbono e é transferido pela biotina (veja Fig. 16-14); o tetraidrofolato transfere unidades monocarbônicas em estado de oxidação intermediário, algumas vezes como grupo metila; a *S*-adenosil-metionina transfere grupos metila, nos quais o carbono está no estado mais baixo de oxidação. Os últimos dois co-fatores são especialmente importantes no metabolismo dos aminoácidos e dos nucleotídeos.

O **tetraidrofolato** (H_4 folato) consiste em uma pteridina substituída (6-metilpterina) de *p*-aminobenzoato e de glutamato unidos entre si (Fig. 18-15). Esse co-fator é sintetizado nas bactérias, e seu precursor folato é uma vitamina para os mamíferos, ele é convertido em tetraidrofolato em um processo de dois passos catalisados pela enzima diidrofolato redutase. A unidade monocarbônica, em qualquer um dos seus três estados de oxidação, está ligada ao N-5 ou ao N-10, ou a ambos. A forma mais reduzida do co-fator transporta um grupo metila, uma forma mais oxidada transporta um grupo metileno e as formas ainda mais oxidadas transportam os grupos metenil, formil ou formimino (Fig. 18-16). As diferentes formas do tetraidrofolato são interconversíveis e servem como doadoras de unidades monocarbônicas em uma variedade de reações biossintéticas. A maior fonte de unidades monocarbônicas para o tetraidrofolato é o carbono removido na conversão de serina à glicina, produzindo N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato.



Pterina

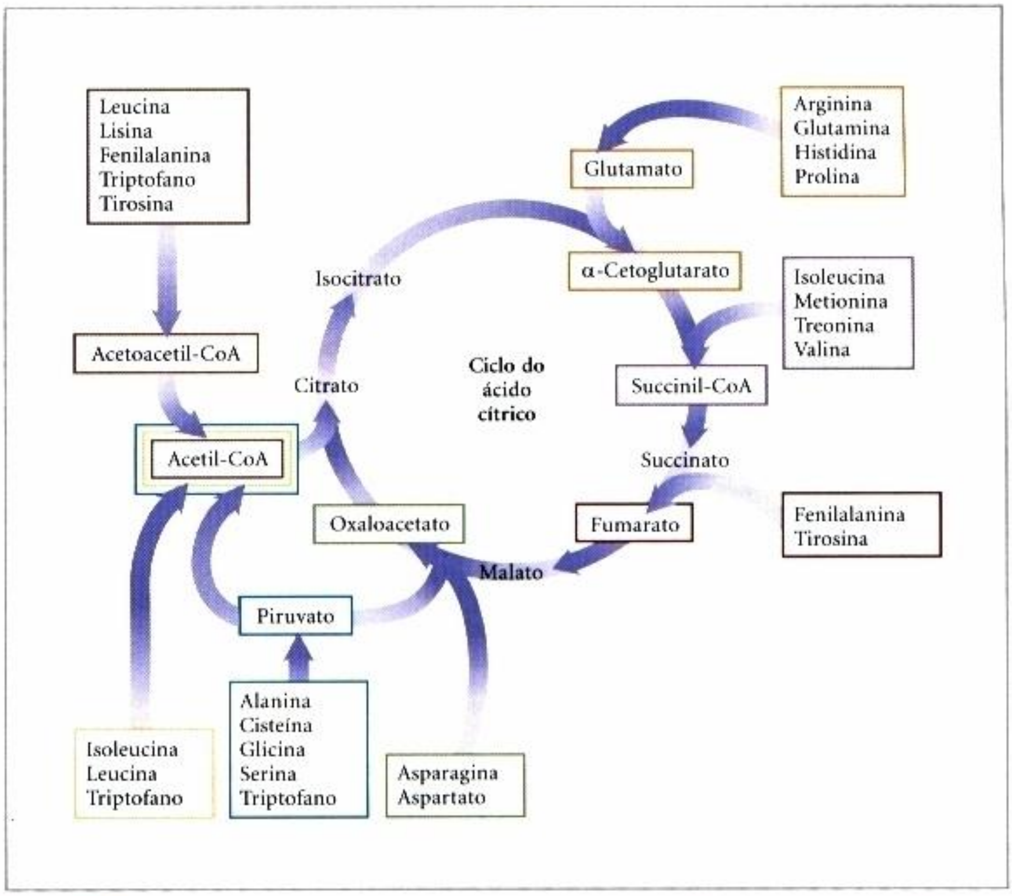

Leucina
Lisina
Fenilalanina
Triptofano
Tirosina
Acetoacetil-CoA
Acetil-CoA
Isocitrato
Citrato
Ciclo do ácido cítrico
Glutamato
Arginina
Glutamina
Histidina
Prolina
α-Cetoglutarato
Isoleucina
Metionina
Treonina
Valina
Succinil-CoA
Succinato
Fumarato
Fenilalanina
Tirosina
Malato
Oxaloacetato
Piruvato
Alanina
Cisteína
Glicina
Serina
Triptofano
Isoleucina
Leucina
Triptofano
Asparagina
Aspartato

Figura 18-14 – Um resumo dos pontos de entrada dos aminoácidos primários no ciclo do ácido cítrico. (Nesta e nas demais figuras ao longo do restante deste capítulo, os retângulos, ao redor dos aminoácidos, estão em colorações que combinam com os sombreados dos produtos finais das vias catabólicas.) Alguns aminoácidos são listados mais que uma vez porque eles liberam mais de um produto final. Este esquema representa as principais vias catabólicas em animais vertebrados, existem, porém, pequenas variações entre diferentes espécies de vertebrados. A treonina, por exemplo, é degradada em acetil-CoA via piruvato em alguns organismos por meio da via ilustrada na Figura 18-18.

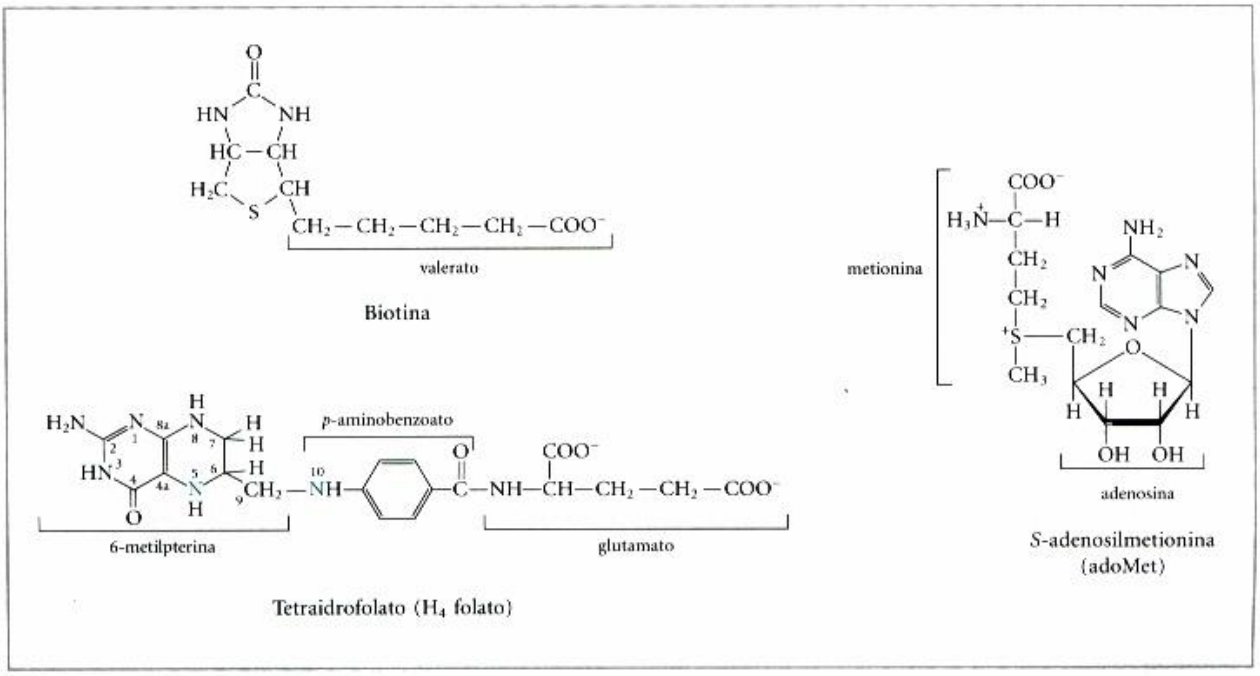

valerato
Biotina
p-aminobenzoato
6-metilpterina
glutamato
Tetraidrofolato (H4 folato)
metionina
adenosina
S-adenosilmetionina (adoMet)

Figura 18-15 – As estruturas dos co-fatores enzimáticos importantes nas reações de transferência das unidades monocarbônicas. Os átomos de nitrogênio aos quais os grupos monocarbônicos são ligados no tetraidrofolato estão mostrados em azul.

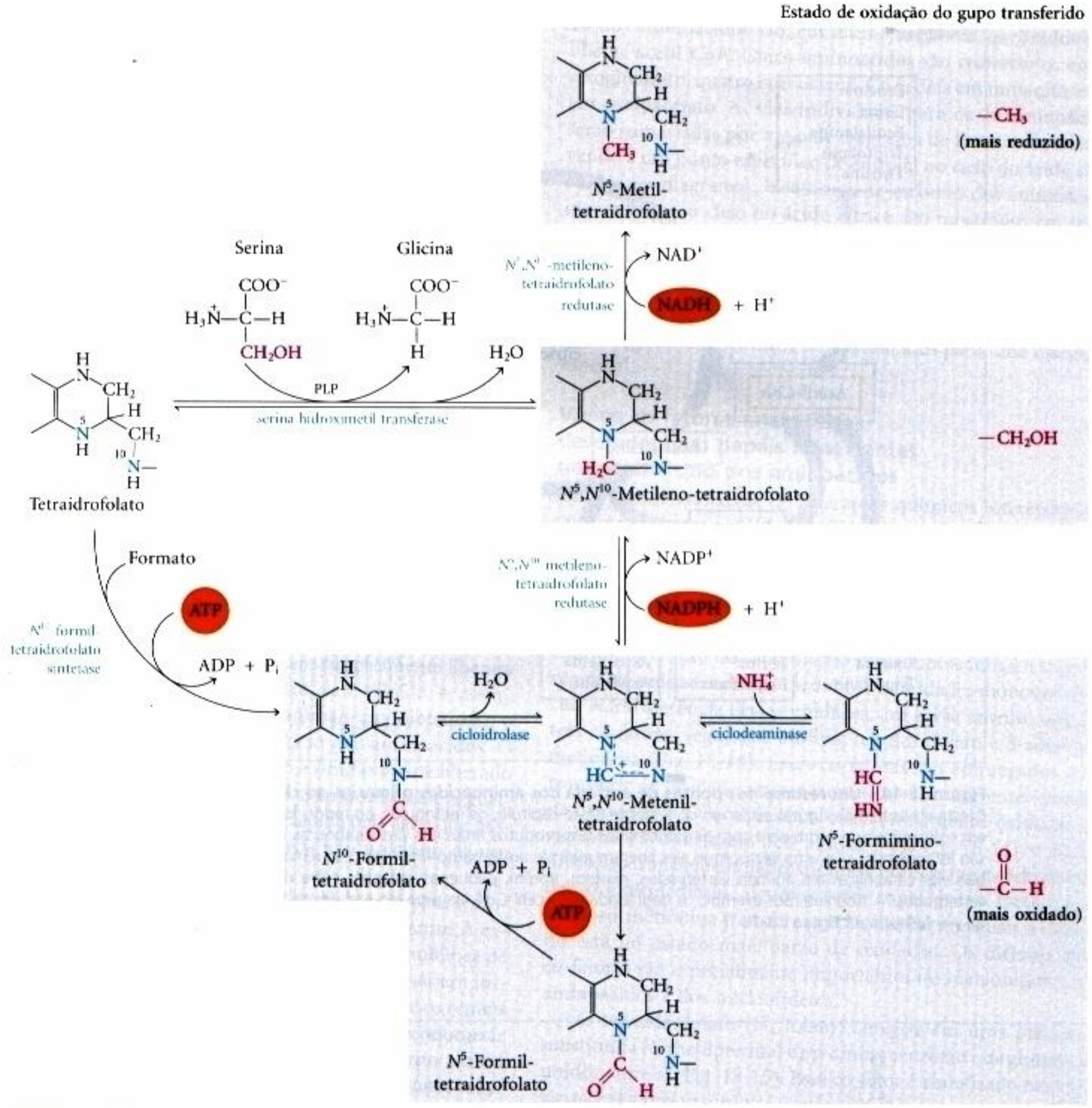

Estado de oxidação do gupo transferido
$-CH_3$
(mais reduzido)
N^5-Metil-tetraidrofolato
Serina
Glicina
PLP
serina hidroximetil transferase
N^5,N^{10}-metileno-tetraidrofolato redutase
NAD^+
NADH
$+ H^+$
H_2O
Tetraidrofolato
N^5,N^{10}-Metileno-tetraidrofolato
$-CH_2OH$
N^5,N^{10}-metileno-tetraidrofolato redutase
$NADP^+$
NADPH
$+ H^+$
Formato
ATP
N^{10}-formil-tetraidrofolato sintetase
ADP + P_i
H_2O
cicloidrolase
NH_4^+
ciclodeaminase
N^{10}-Formil-tetraidrofolato
N^5,N^{10}-Metenil-tetraidrofolato
N^5-Formimino-tetraidrofolato
(mais oxidado)
ADP + P_i
ATP
N^5-Formil-tetraidrofolato

Figura 18-16 – Conversões de unidades monocarbônicas no tetraidrofolato. As diferentes formas moleculares estão agrupadas de acordo com seus estados de oxidação, com os mais reduzidos no topo e os mais oxidados embaixo. Todas as formas, dentro de um único retângulo sombreado, estão no mesmo estado de oxidação. A conversão de N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato em N^5-metiltetraidrofolato é efetivamente irreversível. A transferência enzimática dos grupos formil como na síntese das purinas (veja Fig. 22-30) e na formação da formilmetionina em procariotos (Capítulo 27) geralmente emprega N^{10}-formiltetraidrofolato em vez de N^5-formiltetraidrofolato. Esta última espécie é significativamente mais estável e, portanto, um doador mais fraco de grupos formil. O equilíbrio das reações que interconvertem essas espécies favorece a formação de N^5-formiltetraidrofolato. A conversão de N^5 em N^{10}-formiltetraidrofolato requer ATP, pois, de outra forma, ela teria um equilíbrio desfavorável. Note que N^5-formiminotetraidrofolato é derivado da histidina por meio de uma via mostrada na Figura 18-25.

Embora o tetraidrofolato possa transportar um grupo metila em N-5, o seu potencial de transferência de grupos metila é insuficiente para a maioria das reações biossintéticas. Assim, a **S-adenosilmetionina** (adoMet) é mais freqüentemente empregada para a transferência do grupo metila. Ela é sintetizada de ATP e metionina pela ação da **adenosilmetionina transferase** (Fig. 18-17, passo ①). Essa é uma reação incomum pelo fato de o átomo de enxofre nucleofílico da metionina atacar o carbono 5' da ribose do ATP, liberando trifosfato, em vez de atacar um dos átomos de fósforo. O trifosfato é clivado em P_i e PP_i, ainda na enzima, e, depois, o PP_i é hidrolisado por uma pirofosfatase inorgânica, de tal forma que, nessa reação, são gastas três ligações fosfato de alta energia. A única outra reação conhecida na qual o trifosfato é deslocado do ATP ocorre na síntese da coenzima B_{12} (veja Adendo 17-2, Fig. 3).

Em virtude do seu íon sulfônio desestabilizador, a *S*-adenosilmetionina é um agente alquilante potente. O grupo metila é submetido ao ataque por nucleofílicos e é perto de 1.000 vezes mais reativo que o grupo metila do N^5-metiltetraidrofolato.

A transferência de um grupo metila do *S*-adenosilmetionina para um receptor libera *S*-adenosilomocisteína (Fig. 18-17, passo ②), que é subseqüentemente quebrada em homocisteína

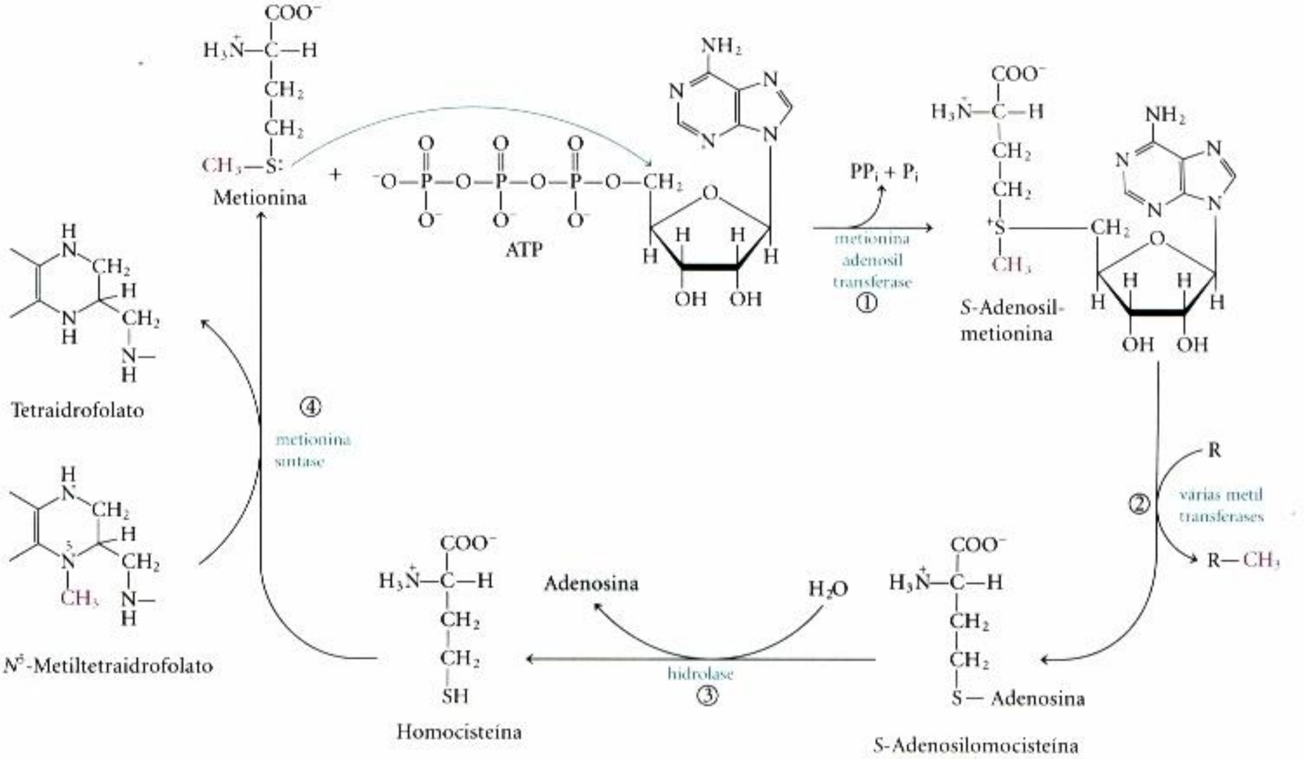
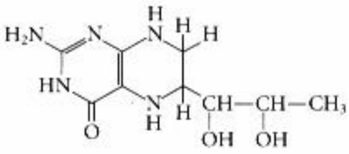


Figura 18-17 – A síntese da metionina e da *S*-adenosilmetionina como parte de um ciclo do grupo metila ativado. Os passos estão descritos no texto. Em alguns organismos, o doador do grupo metila, na reação da metionina sintase, é a metilcobalamina (passo ④). A *S*-adenosilmetionina, que tem um átomo de enxofre carregado positivamente (e, assim, é um íon sulfônio), é um poderoso agente metilante em muitas reações biossintéticas. O receptor do grupo metila é designado R (passo ②).

e adenosina (passo ③). A metionina é regenerada pela transferência de um grupo metila para a homocisteína em uma reação catalisada pela **metionina sintase** (passo ④). A metionina é reconvertida em *S*-adenosilmetionina para completar um ciclo do grupo metila ativado.

Uma forma dessa enzima é comum em bactérias e emprega N^5-metiltetraidrofolato como um doador de metila (como mostrado na Fig. 18-17). Outra forma que ocorre em bactérias e em mamíferos emprega ou o N^5-metiltetraidrofolato ou a metilcobalamina derivada da coenzima B_{12}. Essa reação e o rearranjo da L-metilmalonil-CoA em succinil-CoA (veja Adendo 17-2, Fig. 1a) são as únicas reações conhecidas em mamíferos que são dependentes da coenzima B_{12}. Alguns dos sinais clínicos em pacientes com deficiência da vitamina B_{12} podem ser melhorados com a administração de folato em vez de unicamente vitamina B_{12}. O grupo metila da metilcobalamina é derivado de N^5-metiltetraidrofolato. Como a reação que converte a forma N^5,N^{10}-metileno na forma N^5-metil do tetraidrofolato é irreversível (Fig. 18-16), se a coenzima B_{12} não estiver disponível para a síntese da metilcobalamina, não haverá receptor disponível para o grupo metila do N^5-metiltetraidrofolato, e as moléculas do ácido fólico ficam presas na forma N^5-metil. Esse seqüestro dos folatos em uma única forma pode ser a causa de alguns dos sinais e sintomas que aparecem na anemia perniciosa por deficiência de B_{12}. Entretanto, ainda é ignorado se esse é o único efeito da insuficiência da vitamina B_{12}.

A **tetraidrobiopterina** é outro co-fator que atua no catabolismo dos aminoácidos e é similar à porção pterina do tetraidrofolato, mas ele não está envolvido na transferência de unidades monocarbônicas e participa de reações biológicas de oxidação. O seu modo de ação será considerado quando discutirmos a degradação da fenilalanina.



Tetraidrobiopterina

Dez aminoácidos são degradados até acetil-CoA

Os esqueletos carbônicos de 10 aminoácidos liberam acetil-CoA, o qual entra diretamente no ciclo do ácido cítrico (Fig. 18-14) ou é empregado na biossíntese de lipídios. Desses 10, cinco são degradados até acetil-CoA via piruvato, que pode ser empregado na biossíntese da glicose. Os outros cinco são convertidos em acetil-CoA e/ou em acetoacetil-CoA, que é então clivado para formar o acetil-CoA.

Os cinco aminoácidos que entram via piruvato são: **alanina, glicina, serina, cisteína e triptofano** (Fig. 18-18). Em alguns organismos, a **treonina** é também degradada para formar acetil-CoA. Em humanos, ela é degradada a acetil-CoA, como descrito mais adiante. A alanina libera piruvato diretamente por transaminação com o α-cetoglutarato, e a cadeia lateral do triptofano é separada do restante da molécula para liberar alanina e, portanto, piruvato. A cisteína é convertida em piruvato em dois passos, um para remover o átomo de enxofre e o outro é uma transaminação. A serina é convertida em piruvato pela serina desidratase. Ambos, o grupo β-hidroxila e o grupo α-amino da serina, são removidos nessa única reação dependente de piridoxal fosfato (uma reação análoga com a treonina está mostrada na Fig. 18-26).

A glicina tem duas vias de metabolização. Em uma via importante em bactérias, ela pode ser convertida em serina pela adição enzimática de um grupo hidroximetila (Fig. 18-19a). Essa

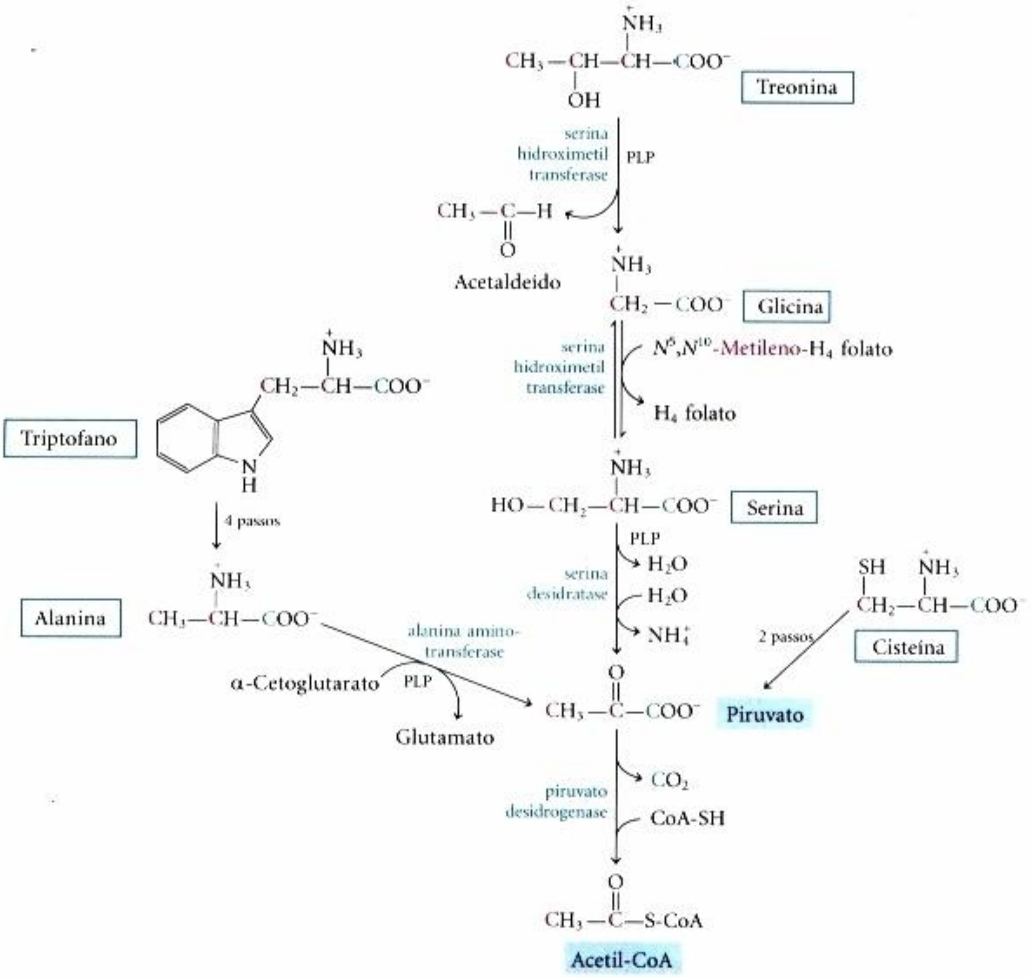

Treonina
serina hidroximetil transferase
PLP
Acetaldeído
Glicina
serina hidroximetil transferase
N⁵,N¹⁰-Metileno-H₄ folato
H₄ folato
Triptofano
4 passos
Serina
PLP
serina desidratase
H₂O
H₂O
NH₄⁺
Cisteína
2 passos
Alanina
alanina aminotransferase
α-Cetoglutarato
PLP
Glutamato
Piruvato
piruvato desidrogenase
CO₂
CoA-SH
Acetil-CoA

Figura 18-18 – Esquemas das vias catabólicas dos aminoácidos: alanina, glicina, serina, cisteína, triptofano e treonina. O destino do grupo indol do triptofano está mostrado na Figura 18-20. Detalhes da conversão da glicina em serina e de um segundo destino para a glicina estão mostrados na Figura 18-19. Na espécie humana, a treonina é degradada por uma outra via (veja Fig. 18-23). Existem várias vias para a degradação da cisteína, todas elas levando ao piruvato. O enxofre da cisteína tem vários destinos alternativos, um deles está mostrado na Figura 22-15. A enzima serina hidroximetil transferase contém duas coenzimas: piridoxal fosfato e tetraidrofolato. Além da codificação por cores para as vias metabólicas descritas na Figura 18-14, nesta e nas figuras subseqüentes, os átomos de carbono também estão codificados por cores, de maneira a ser possível seguir seus destinos.

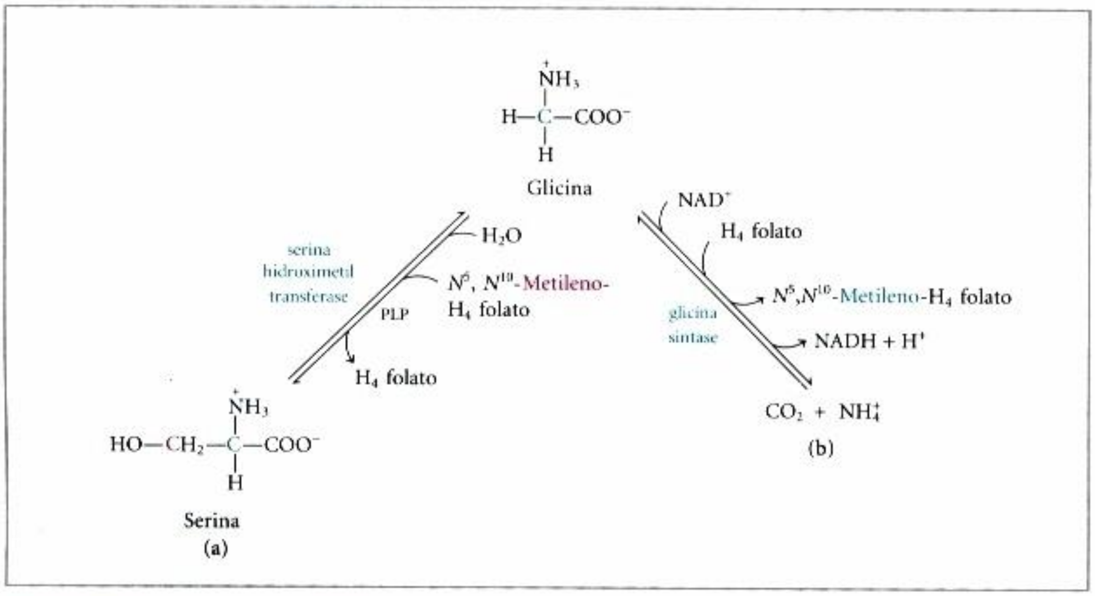

Glicina
serina hidroximetil transferase
H₂O
N⁵, N¹⁰-Metileno-H₄ folato
PLP
H₄ folato
Serina
(a)
NAD⁺
H₄ folato
glicina sintase
N⁵,N¹⁰-Metileno-H₄ folato
NADH + H⁺
CO₂ + NH₄⁺
(b)

Figura 18-19 – Dois destinos metabólicos da glicina: (**a**) conversão em serina e (**b**) quebra até CO_2 e amônia. O cofator tetraidrofolato transporta unidades monocarbônicas nestas duas reações. (Veja Figs. 18-16 e 18-17.)

reação, catalisada pela **serina hidroximetil transferase**, requer as coenzimas tetraidrofolato e piridoxal fosfato. A segunda via para glicina, que predomina nos animais, envolve a sua clivagem oxidativa em CO_2, NH_4^+ e um grupo metileno (—CH_2—) (Fig. 18-19b). Essa reação livremente reversível, catalisada pela **glicina sintase**, também requer tetraidrofolato, o qual aceita o grupo metileno. Nessa via de clivagem oxidativa, os dois átomos de carbono da glicina não entram no ciclo do ácido cítrico. Um é perdido como CO_2, e o outro torna-se o grupo metileno do N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato (Fig. 18-16), o qual é empregado como doador de grupos monocarbônicos em certas vias biossintéticas.

Porções do esqueleto carbônico de seis aminoácidos: **triptofano**, **lisina**, **fenilalanina**, **tirosina**, **leucina** e **isoleucina**, liberam acetil-CoA, acetoacetil-CoA ou ambos; o último sendo, então, convertido em acetil-CoA (Fig. 18-20). Alguns dos passos finais nas vias degradativas da leucina, lisina e triptofano lembram os passos da oxidação dos ácidos graxos. Merece especial atenção a quebra de dois desses seis aminoácidos.

A quebra do triptofano é a mais complexa de todas as vias do catabolismo dos aminoácidos nos tecidos animais; porções do triptofano (que possui um total de seis átomos de carbono) liberam acetil-CoA por duas vias diferentes, uma por meio do piruvato e a outra por meio do acetoacetil-CoA. Alguns dos intermediários no catabolismo do triptofano são precursores necessários para a biossíntese de outras biomoléculas importantes (Fig. 18-21), incluindo nicotinato, um precursor do NAD e do NADP nos animais. O triptofano é também o ancestral, por uma via diferente, do neurotransmissor serotonina. Nos vegetais, o fator de crescimento indolacetato é derivado do triptofano por uma via oxidativa. Algumas dessas vias biossintéticas estão descritas com mais detalhes no Capítulo 22 (veja Figs. 22-2b e 22-27).

A quebra da fenilalanina é importante, porque defeitos genéticos nas enzimas do seu catabolismo provocam várias doenças hereditárias na espécie humana (Fig. 18-22). A fenilalanina e a tirosina, seu produto de oxidação (ambos com nove átomos de carbono), são degradadas em dois fragmentos, cada um deles pode entrar no ciclo do ácido cítrico, porém em pontos diferentes. Quatro dos nove átomos de carbono da fenilalanina e da tirosina formam acetoacetato livre, que é convertido em acetoacetil-CoA, e este, em acetil-CoA. Um segundo fragmento de quatro átomos de carbono da tirosina e da fenilalanina é recuperado como fumarato. Portanto, dos nove átomos de carbono de cada um desses dois aminoácidos, oito entram no ciclo do ácido cítrico; o carbono remanescente é perdido como CO_2. A fenilalanina, depois de sua hidroxilação para formar tirosina, é também a precursora dos hormônios epinefrina e norepinefrina, secretados pela medula da glândula adrenal e do neurotransmissor dopamina (veja Fig. 22-27). Também é derivada da tirosina a melanina, o pigmento negro da pele e dos cabelos.

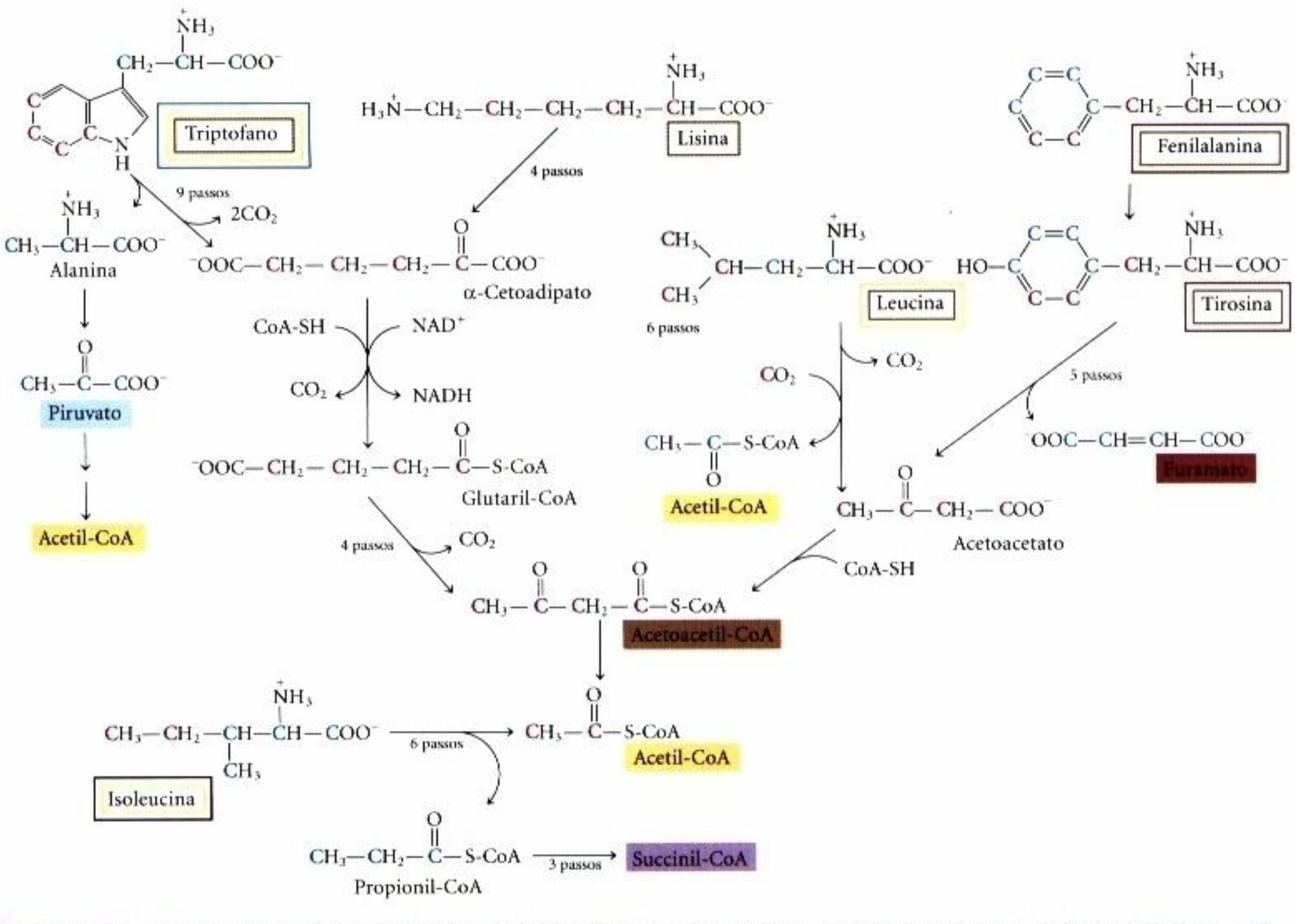


Figura 18-20 – Resumo dos destinos catabólicos dos aminoácidos: triptofano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina. Esses aminoácidos fornecem alguns dos seus átomos de carbono (em vermelho) para o acetil-CoA. O triptofano, a fenilalanina, a tirosina e a isoleucina também contribuem com átomos de carbono (em azul), tanto como piruvato quanto como outros intermediários do ciclo do ácido cítrico. A via da fenilalanina está descrita com mais detalhes na Figura 18-22. O destino dos átomos de nitrogênio não está descrito nesta figura. Na maioria dos casos, eles são transferidos para o α-cetoglutarato para formar glutamato.

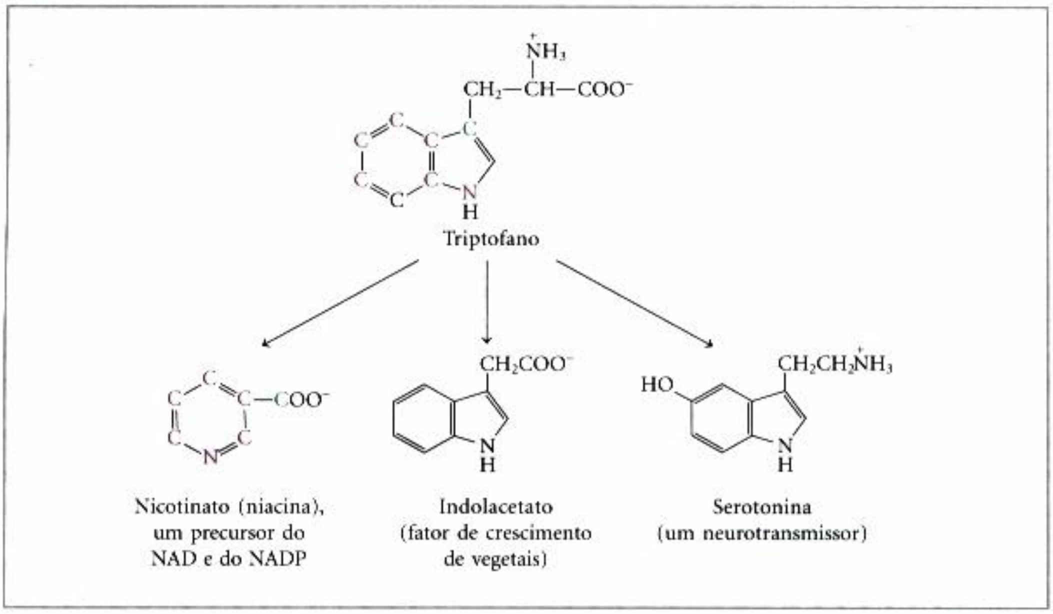

$\overset{+}{N}H_3$
$CH_2-CH-COO^-$
Triptofano
CH_2COO^-
$CH_2CH_2\overset{+}{N}H_3$
HO
N
H
$C-COO^-$
Nicotinato (niacina), um precursor do NAD e do NADP
Indolacetato (fator de crescimento de vegetais)
Serotonina (um neurotransmissor)

Figura 18-21 – O triptofano como precursor. Os anéis aromáticos do triptofano são precursores do nicotinato, do indolacetato e da serotonina. Símbolos atômicos coloridos são empregados para acompanhar a origem dos átomos no anel do nicotinato.

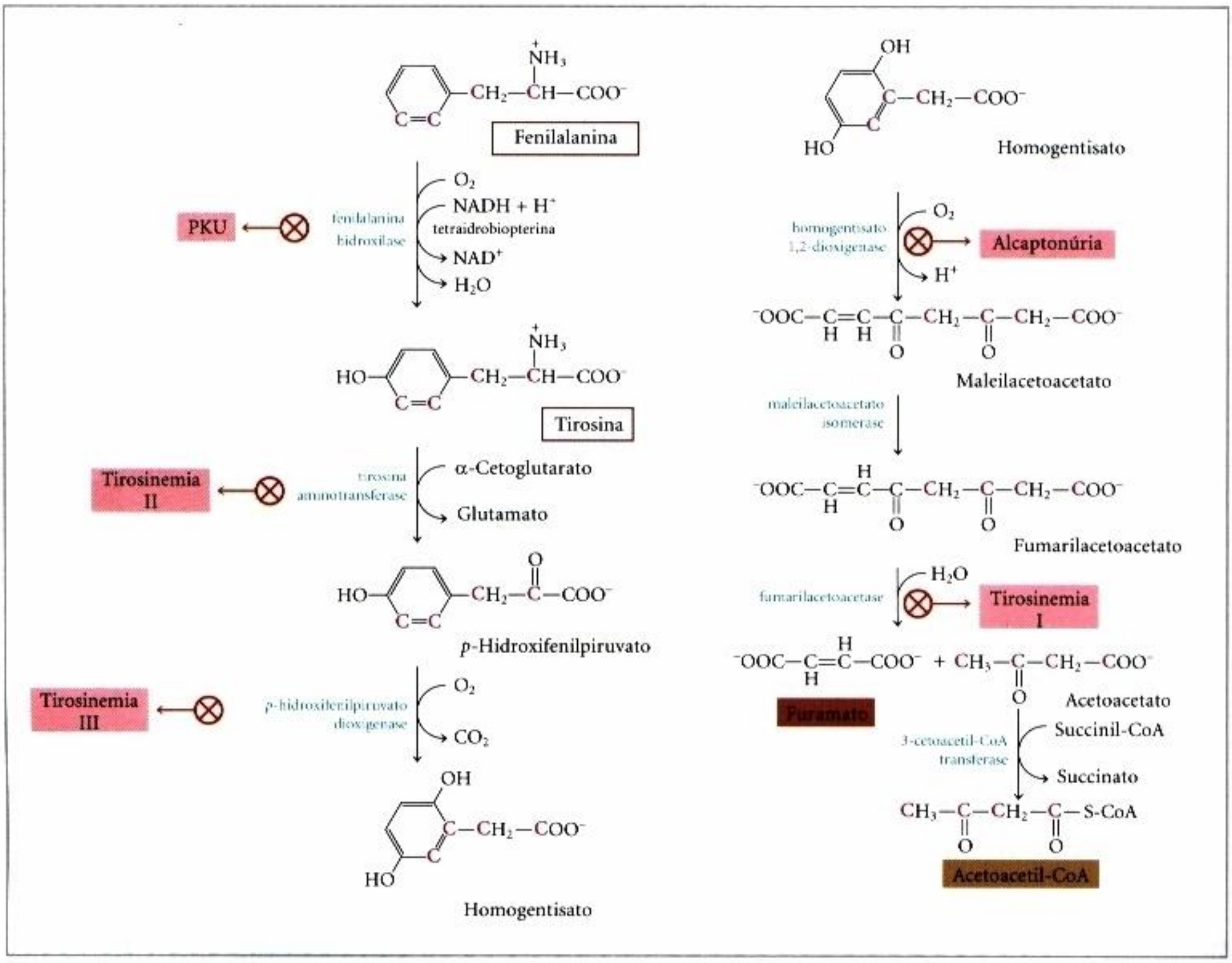

$\overset{+}{N}H_3$
$CH_2-CH-COO^-$
Fenilalanina
PKU
fenilalanina hidroxilase
O_2
NADH + H^+
tetraidrobiopterina
NAD^+
H_2O
HO
Tirosina
Tirosinemia II
tirosina aminotransferase
α-Cetoglutarato
Glutamato
$CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-COO^-$
p-Hidroxifenilpiruvato
Tirosinemia III
p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase
O_2
CO_2
OH
$C-CH_2-COO^-$
Homogentisato
homogentisato 1,2-dioxigenase
O_2
Alcaptonúria
H^+
$^-OOC-CH=CH-CO-CH_2-CO-CH_2-COO^-$
Maleilacetoacetato
maleilacetoacetato isomerase
Fumarilacetoacetato
fumarilacetoacetase
H_2O
Tirosinemia I
$^-OOC-CH=CH-COO^-$ + $CH_3-CO-CH_2-COO^-$
Fumarato
Acetoacetato
3-cetoacetil-CoA transferase
Succinil-CoA
Succinato
$CH_3-CO-CH_2-CO-S\text{-}CoA$
Acetoacetil-CoA

Figura 18-22 – Vias catabólicas para a fenilalanina e para a tirosina. A via normal de conversão da fenilalanina e da tirosina em acetoacetil-CoA e fumarato na espécie humana. São conhecidos defeitos genéticos que atingem cada uma das primeiras quatro enzimas desta via e que provocam doenças hereditárias (sombreadas em vermelho).

Em algumas pessoas, o catabolismo da fenilalanina é geneticamente defeituoso

São muitos os defeitos genéticos diferentes identificados no metabolismo dos aminoácidos na espécie humana (Tabela 18-2). A maioria desses defeitos provoca o acúmulo de intermediários metabólicos específicos, uma condição que pode provocar defeitos no desenvolvimento do sistema nervoso e retardo mental. Por exemplo, um defeito genético na **fenilalanina hidroxilase,** a primeira enzima na via catabólica da fenilalanina (Fig. 18-22), é responsável pela doença **fenilcetonúria** (**PKU**), a causa mais comum de níveis elevados de fenilalanina no sangue (hiperfenilalaninemia).

A primeira enzima na via catabólica da fenilalanina (Fig. 18-22), **fenilalanina hidroxilase**, catalisa a hidroxilação da fenilalanina em tirosina. Um defeito genético na fenilalanina hidroxilase é responsável pela doença chamada **fenilcetonúria (PKU).** A fenilcetonúria é a causa mais comum de níveis elevados de fenilalanina no sangue (hiperfenilalaninemia). A **fenilalanina hidroxilase** insere um dos dois átomos de oxigênio do O_2 na fenilalanina para formar o grupo hidroxila da tirosina; o outro átomo do oxigênio é reduzido a H_2O pelo NADH, que também é necessário na reação. Essa é uma de uma classe geral de reações catalisadas por enzimas chamadas **oxidases de função mista** (veja Adendo 21-1), todas as quais catalisam, simultaneamente, a hidroxilação de um substrato pelo O_2 e a redução a H_2O do átomo de oxigênio restante do O_2. A fenilalanina hidroxilase requer um co-fator, a tetraidrobiopterina, que transporta elétrons do NADH para o O_2 na hidroxilação da fenilalanina. Durante a reação da hidroxilação, a coenzima é oxidada em diidrobiopterina (Fig. 18-23) e, subseqüentemente, ela é reduzida novamente pela ação da enzima **diidrobiopterina redutase**, em uma reação que requer NADH.

Tabela 18-2 – Algumas doenças genéticas que afetam o catabolismo dos aminoácidos

Nome da doença	Incidência aproximada (por 100.000 nascimentos)	Processo afetado	Enzima afetada	Efeitos e sintomas
Albinismo	3	Síntese da melanina a partir da tirosina	Tirosina-3-monoxigenase (tirosinase)	Ausência de pigmentação, cabelos brancos e pele rósea
Alcaptonúria	0,4	Degradação da tirosina	Homogentisato 1,2-dioxigenase	Presença de pigmento escuro na urina e posterior desenvolvimento de artrite
Argininemia	< 0,5	Síntese da uréia	Arginase	Retardo mental
Acidemia argininossuccínica	1,5	Síntese da uréia	Argininossuccinato liase	Vômitos e convulsões
Deficiência da carbamil fosfato sintetase I	> 0,5	Síntese da uréia	Carbamil fosfato sintetase I	Letargia, convulsões, morte precoce
Homocistinúria	0,5	Degradação da metionina	Cistationina β-sintase	Desenvolvimento ósseo defeituoso e retardo mental
Doença da urina em xarope de bordo (cetoacidúria de cadeia ramificada)	0,4	Degradação da leucina, isoleucina e valina	Complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada	Vômitos, convulsões, retardo mental, morte precoce
Acidemia metilmalônica	< 0,5	Conversão do propionil-CoA em succinil-CoA	Metilmalonil-CoA mutase	Vômitos, convulsões, retardo mental, morte precoce
Fenilcetonúria	8	Conversão da fenilalanina em tirosina	Fenilalanina hidroxilase	Vômitos no período neonatal e retardo mental

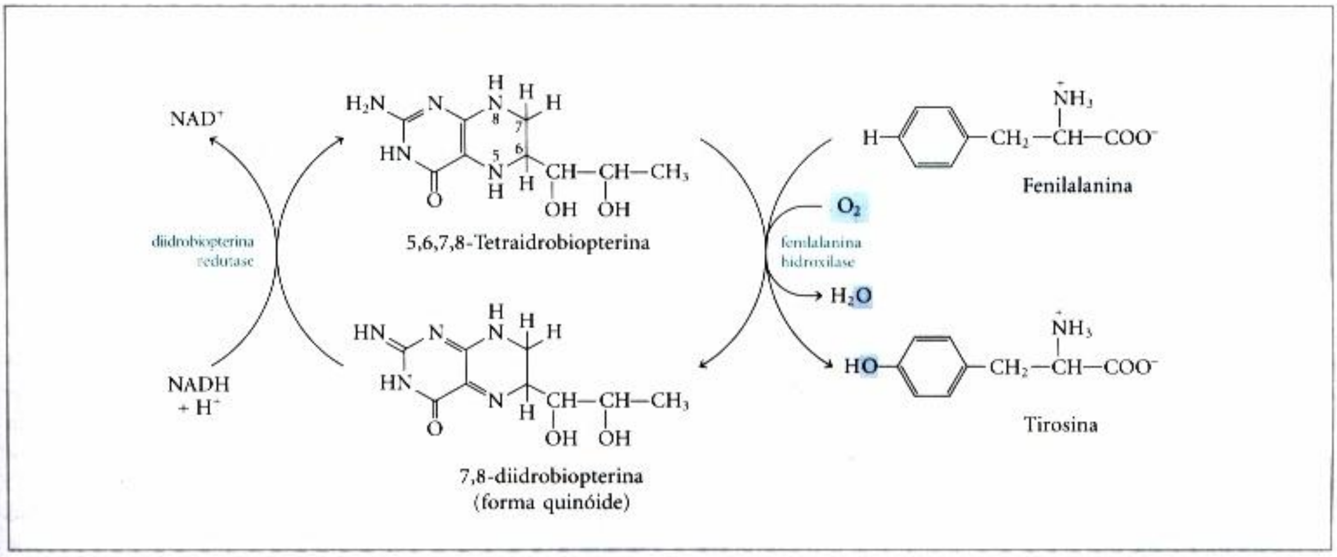

NAD⁺
diidrobiopterina redutase
NADH + H⁺
5,6,7,8-Tetraidrobiopterina
7,8-diidrobiopterina (forma quinóide)
O₂
fenilalanina hidroxilase
H₂O
Fenilalanina
Tirosina

Figura 18-23 – O papel da tetraidrobiopterina na reação catalisada pela fenilalanina hidroxilase. Note que o NADH é necessário para restaurar a forma reduzida da coenzima.

Nas pessoas com PKU, uma via secundária do metabolismo da fenilalanina, normalmente pouco empregada, passa a ter grande atuação. Nessa via menor, a fenilalanina sofre transaminação com o piruvato para liberar **fenilpiruvato** (Fig. 18-24). A fenilalanina e o fenilpiruvato acumulam-se no sangue e nos tecidos e são excretados na urina: daí o nome: "fenilcetonúria". A maior parte do fenilpiruvato não é excretada como tal, mas é descarboxilada para produzir fenilacetato ou reduzida para formar fenilactato. O fenilacetato confere um odor tão característico à urina, que é empregado pelas enfermeiras para detectar a PKU em crianças. O acúmulo de fenilalanina, ou de seus metabólitos, nos primeiros dias de vida, impede o desenvolvimento normal do cérebro, provocando retardo mental severo. O excesso de fenilalanina pode competir com outros aminoácidos pelo transporte atráves da barreira hematoencefálica, resultando em uma depressão de alguns metabólitos muito necessários.

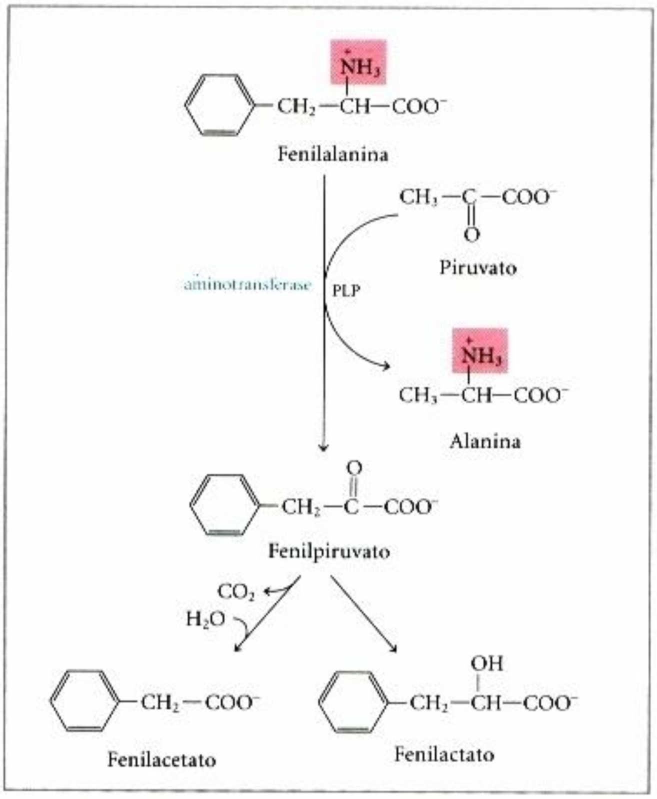


Figura 18-24 – Vias alternativas para o catabolismo da fenilalanina em pessoas com fenilcetonúria. O fenilpiruvato acumula-se nos tecidos, no sangue e na urina. O fenilacetato e o fenilactato também podem ser encontrados na urina.

A fenilcetonúria foi um dos primeiros defeitos genéticos do metabolismo humano a ser descoberto. Quando essa doença é diagnosticada a tempo, ainda nos primeiros dias de vida, o retardo mental pode ser prevenido em grande extensão por meio de um controle dietético rígido. A dieta precisa suprir as quantidades de fenilalanina e de tirosina exatamente necessárias e suficientes para satisfazer as necessidades de síntese protéica do organismo. O consumo de alimentos que são ricos em proteínas precisa ser diminuído e controlado. As proteínas naturais, como a caseína do leite, devem primeiro ser hidrolisadas e a maior parte da fenilalanina removida, a fim de se obter uma dieta apropriada, ao menos para as crianças portadoras da fenilcetonúria. Alimentos adoçados artificialmente com aspartame (um dipeptídeo do éster metílico de fenilalanina e aspartato; veja Fig. 3-14) devem receber rótulos com advertências para indivíduos com intolerância à fenilalanina.

A fenilcetonúria também pode ser causada por um defeito na enzima que catalisa a regeneração da tetraidrobiopterina (Fig. 18-23). Nesses casos, o tratamento é mais complexo do que aquele realizado com uma dieta que restringe a ingestão de fenilalanina e de tirosina. Como a tetraidrobiopterina também é necessária para formação de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-dopa) e de 5-hidroxitriptofano (precursores essenciais dos neurotransmissores norepinefrina e serotonina, respectivamente), esses compostos precisam ser suplementados na dieta. Entretanto, é insuficiente apenas suplementar tetraidrobiopterina na dieta, pois esta é instável e não atravessa a barreira hematoencefálica.

Testar todos os recém-nascidos para descobrir os que são portadores de doenças genéticas pode ser altamente recompensador, mesmo do ponto de vista econômico, especialmente no caso da PKU. Não só pelos testes de detecção, que são relativamente baratos (embora não mais dependentes do odor da urina) mas, principalmente, pelo fato de o tratamento precoce das crianças afetadas (8 a 10 casos por 100.000 indivíduos) economizar, a cada ano, quantidades enormes de recursos que, de outra forma, teriam de ser gastos em cuidados especiais por programas de instituições que cuidam dos retardados mentais. Obviamente, visto pelo aspecto humano do problema, evitar os traumas emocionais por meio desses testes simples é de valor inestimável.

A **alcaptonúria** é outra doença hereditária do catabolismo da fenilalanina, nela a enzima defeituosa é a **homogentisato dioxigenase.** Menos grave que a PKU, essa doença produz poucos efeitos deletérios, apesar de serem excretadas grandes quantidades de homogentisato que, oxidadas, conferem à urina cor negra. Pessoas com alcaptonúria também desenvolvem, com freqüência, uma forma de artrite. A alcaptonúria tem grande importância histórica e foi estudada por Archibald Garrod no início do século XX. Garrod descobriu que a doença era herdada e pôde relacioná-la com a ausência de uma única enzima; portanto, foi o primeiro a fazer a conexão entre um traço herdado e uma enzima, um grande avanço no caminho que, em última instância, levou ao nosso entendimento atual do papel biológico dos genes e das vias de informação descritas na Parte IV deste livro.

Cinco aminoácidos são convertidos em α-cetoglutarato

Os esqueletos carbônicos de cinco aminoácidos (arginina, histidina, glutamato, glutamina e prolina) entram no ciclo do ácido cítrico por meio do α-cetoglutarato (Fig. 18-25). **Prolina, glutamato** e **glutamina** possuem esqueletos com cinco átomos de carbono. A estrutura cíclica da prolina é rompida e aberta por oxidação do carbono mais distante do grupo carboxila para criar uma base de Schiff e pela hidrólise dessa base de Schiff em um semi-aldeído linear (glutamato γ-semi-aldeído). Este é ainda mais oxidado no mesmo átomo de carbono para produzir glutamato. A conversão de glutamina em glutamato é realizada pela ação da glutaminase, ou por qualquer uma das muitas reações nas quais a glutamina entrega o seu nitrogênio amida para algum receptor. A transaminação ou desaminação do glutamato produz o α-cetoglutarato.

A **arginina** e a **histidina** possuem cinco átomos de carbono adjacentes e um sexto carbono ligado por meio de um átomo de nitrogênio. Portanto, a conversão catabólica desses dois aminoácidos em glutamato é um pouco mais complexa que a via até

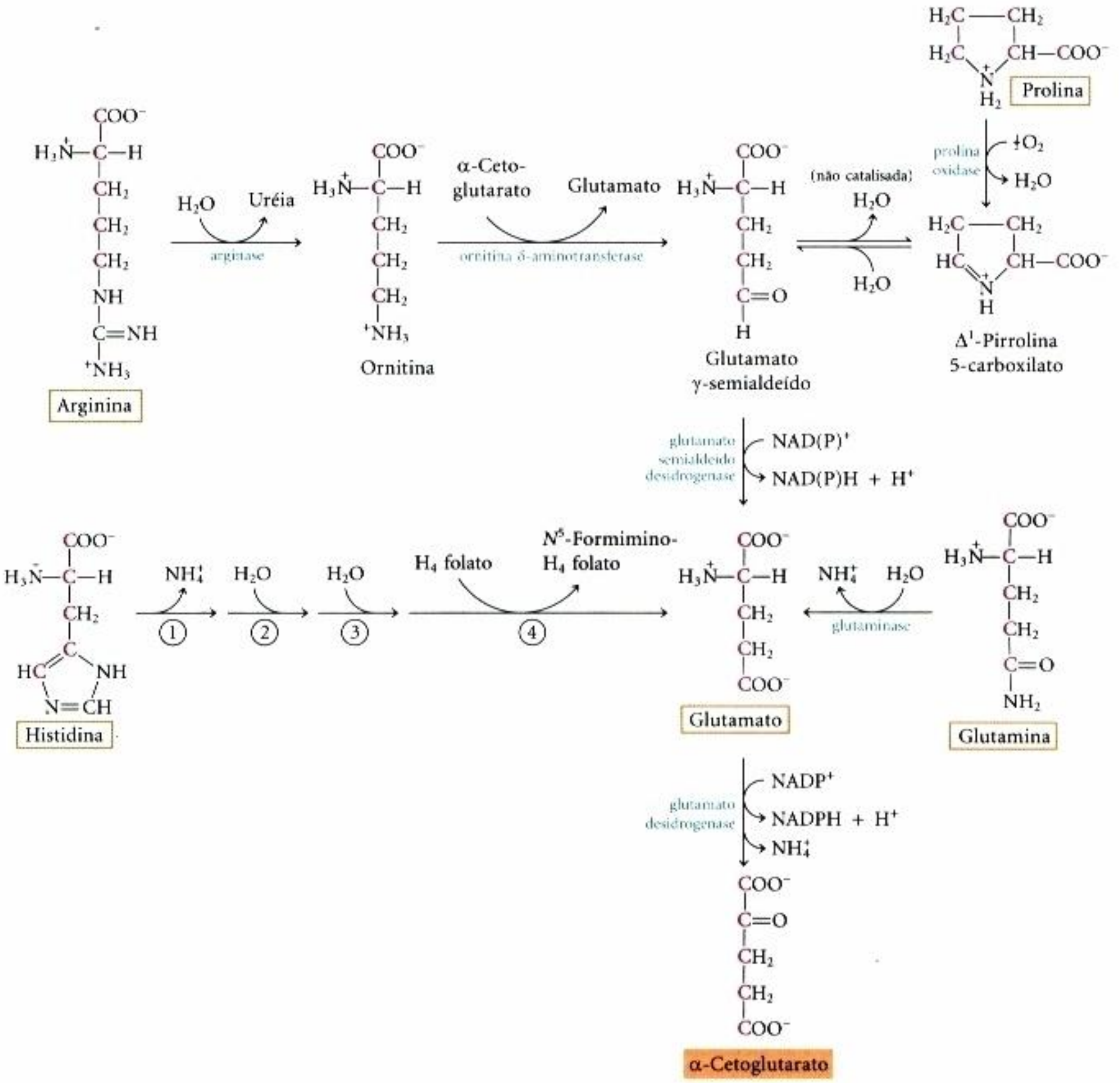

Prolina
prolina oxidase
½O₂
H₂O
Arginina
H₂O
Uréia
arginase
Ornitina
α-Ceto-glutarato
Glutamato
ornitina δ-aminotransferase
(não catalisada)
H₂O
H₂O
Glutamato γ-semialdeído
Δ¹-Pirrolina 5-carboxilato
glutamato semialdeído desidrogenase
NAD(P)⁺
NAD(P)H + H⁺
Histidina
NH₄⁺
H₂O
H₂O
H₄ folato
N⁵-Formimino-H₄ folato
① ② ③ ④
Glutamato
NH₄⁺
H₂O
glutaminase
Glutamina
glutamato desidrogenase
NADP⁺
NADPH + H⁺
NH₄⁺
α-Cetoglutarato

Figura 18-25 – Esquemas das vias catabólicas para os aminoácidos: arginina, histidina, glutamato, glutamina e prolina. Todos são convertidos em α-cetoglutarato. Os passos numerados na via da histidina são catalisados por: ① histidina amônia liase; ② urocanato hidratase; ③ imidazolonapropionase e ④ glutamato formimino transferase.

glutamato da prolina ou da glutamina (Fig. 18-25). No ciclo da uréia (veja Fig. 18-9), a **arginina** é convertida no esqueleto carbônico de cinco átomos da ornitina e esta é transaminada em glutamato γ-semi-aldeído. A conversão de histidina na estrutura de cinco átomos de carbono do glutamato ocorre em uma via de muitos passos; o carbono extra é removido em um passo que emprega tetraidrofolato como co-fator.

Quatro aminoácidos são convertidos em succinil-CoA

Os esqueletos carbônicos da metionina, da isoleucina, da treonina e da valina são degradados por vias que formam a succinil-CoA (Fig. 18-26), um intermediário do ciclo do ácido cítrico. A **metionina** doa o seu grupo metila para um de vários receptores possíveis por meio da *S*-adenosilmetionina, e três, dos quatro átomos remanescentes do seu esqueleto carbônico, são convertidos naqueles do propionato, na forma de propionil-CoA, um precursor do succinil-CoA. A **isoleucina** sofre transaminação seguida de descarboxilação oxidativa do α-cetoácido resultante. O esqueleto remanescente com cinco átomos de carbono derivado da isoleucina sofre uma oxidação posterior, liberando acetil-CoA e propionil-CoA. A **valina** sofre transaminação e descarboxilação e, a seguir, uma série de reações de oxidação que converte os quatro carbonos remanescentes em propionil-CoA. Algumas partes da via de degradação da valina e da isoleucina têm estreito paralelismo de passos na degradação dos ácidos graxos (veja Fig. 17-8). Nos tecidos humanos, a **treonina** também é convertida em propionil-CoA. O propionil-CoA, derivado desses três aminoácidos, é convertido em succinil-CoA por uma via descrita no Capítulo 17: carboxilação para metilmalonil-CoA, epimerização do metilmalonil-CoA e conversão em succinil-CoA pela metilmalonil-CoA mutase, dependente da coenzima B_{12} (veja Fig. 17-12). Na doença genética rara, conhecida como acidemia metilmalônica, ocorre a falta da metilmalonil-CoA mutase, com conseqüências metabólicas muito graves (Tabela 18-2, Adendo 18-2).

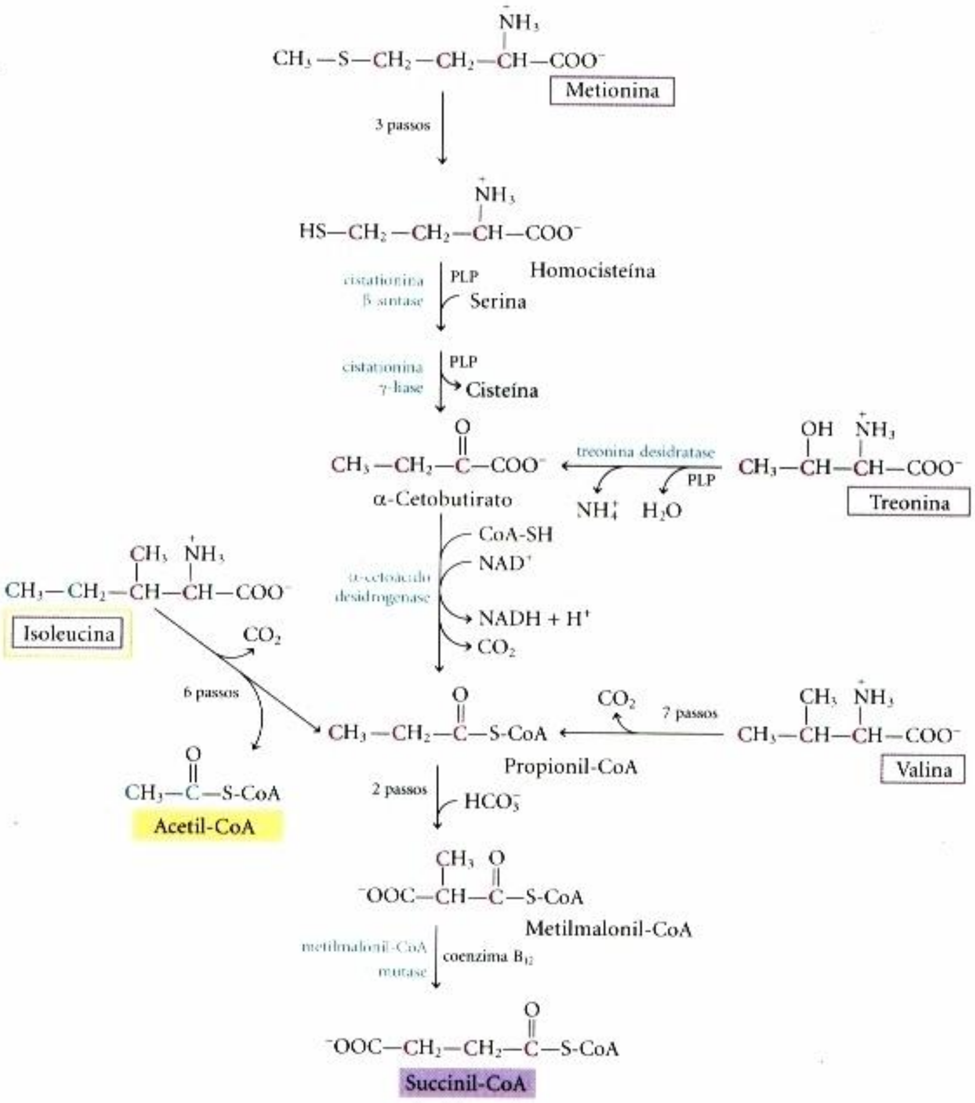

Metionina
3 passos
Homocisteína
cistationina β sintase
PLP
Serina
cistationina γ-liase
PLP
Cisteína
α-Cetobutirato
treonina desidratase
PLP
NH_4^+
H_2O
Treonina
CoA-SH
NAD^+
α-cetoácido desidrogenase
NADH + H^+
CO_2
Isoleucina
CO_2
6 passos
Acetil-CoA
Propionil-CoA
CO_2
7 passos
Valina
2 passos
HCO_3^-
Metilmalonil-CoA
metilmalonil-CoA mutase
coenzima B_{12}
Succinil-CoA

Figura 18-26 – Esquema das vias metabólicas da metionina, isoleucina, treonina e valina. Estes aminoácidos são convertidos em succinil-CoA. A isoleucina também contribui com dois dos seus átomos de carbono para o acetil-CoA (veja Fig. 18-20). A via da treonina mostrada aqui ocorre em humanos. Outra via para a degradação da treonina está mostrada na Figura 18-18. A via da metionina para homocisteína está descrita com mais detalhes na Figura 18-17. Os passos que convertem homocisteína em α-cetobutirato estão ilustrados na Figura 22-14. A conversão de propionil-CoA em succinil-CoA foi descrita na Figura 17-11.

Os aminoácidos de cadeia ramificada não são degradados no fígado

Embora a maior parte do catabolismo dos aminoácidos ocorra no fígado, os três aminoácidos com cadeias laterais ramificadas (leucina, isoleucina e valina) são oxidados como combustíveis, principalmente nos tecidos muscular, adiposo, renal e cerebral. Esses tecidos extra-hepáticos contêm uma única aminotransferase que não está presente no fígado e que age em todos os três aminoácidos de cadeia ramificada para produzir os correspondentes α-cetoácidos (Fig. 18-27). O complexo enzimático denominado **α-cetoácido de cadeia lateral ramificada desidrogenase** catalisa a descarboxilação oxidativa de todos os três α-cetoácidos. De cada um deles, ela libera a carboxila como CO_2 e produz o acil-CoA correspondente. Essa reação é formalmente análoga a duas outras descarboxilações oxidativas encontradas no Capítulo 16: a oxidação do piruvato a acetil-CoA pelo complexo da desidrogenase pirúvica (veja Fig. 16-6) e a oxidação do α-cetoglutarato a succinil-CoA pelo complexo da α-cetoglutarato desidrogenase (pág. 447). De fato, os três complexos enzimáticos são de estrutura similiar e compartilham o mesmo mecanismo de reação. São empregados cinco co-fatores: tiamina pirofosfato, FAD, NAD, lipoato e coenzima A, e as três proteínas em cada complexo catalisam reações homólogas. Esse é, claramente, um caso no qual a maquinaria enzimática, que evoluiu para catalisar um reação, foi copiada por duplicação do gene e depois evoluiu para catalisar reações semelhantes em outras vias.

O complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada do rato é regulado por modificação covalente em resposta ao conteúdo em aminoácidos de cadeia ramificada na dieta. Quando a ingestão por meio da dieta dos aminoácidos com cadeia ramificada é feita com pequeno ou nenhum excesso deles, o complexo enzimático da desidrogenase dos amino-

Adendo 18-2 Detetives científicos resolvem um assassinato misterioso

Algumas vezes, a realidade pode ser mais estranha do que a ficção — ou, pelo menos, tão estranha quanto um filme feito para a televisão. Veja, por exemplo, o caso de Patrícia Stallings. Ela foi condenada pelo assassinato de seu filho pequeno e sentenciada à prisão perpétua, mas, depois, graças às investigações de três cientistas persistentes, foi declarada inocente.

A história começa no verão de 1989, quando Stallings levou seu filho Ryan, de três meses de idade, para a sala de emergência do Cardinal Glennon Children's Hospital, em Saint Louis, no estado norte-americano do Missouri. A criança apresentava respiração difícil, vômitos incontroláveis e desconforto gástrico. De acordo com o médico atendente, um toxicologista, os sintomas da criança indicavam que ela tinha sido intoxicada com etilenoglicol, um ingrediente de líquidos anticongelantes, uma conclusão aparentemente confirmada por análises realizadas em um laboratório comercial.

Depois que se recuperou, a criança foi colocada em um lar adotivo e Patrícia e seu marido, David, permitidos de vê-la apenas em visitas supervisionadas. Entretanto, quando Ryan tornou a ficar doente, e subseqüentemente morreu, depois de uma visita na qual Patrícia esteve brevemente sozinha com ele, ela foi acusada de assassinato em primeiro grau e mantida presa sem direito à fiança. As evidências contra ela pareciam muito fortes, já que o laboratório comercial e o laboratório do hospital encontraram grande quantidade de etilenoglicol no sangue do menino e traços dele em uma garrafa de leite com a qual Patrícia tinha alimentado seu filho durante a visita.

Entretanto, mesmo sem saber, Patrícia tinha realizado um brilhante experimento. Durante o tempo de sua prisão preventiva, ela soube que estava grávida e, subseqüentemente, em fevereiro de 1990, ela deu a luz a outro filho: David Stallings Júnior. O recém-nascido foi imediatamente colocado em um lar adotivo, mas, dentro de duas semanas, começou a ter sintomas semelhantes ao de Ryan. Posteriormente, David foi diagnosticado como portador de um distúrbio metabólico raro chamado de acidemia metilmalônica (MMA). Este é um distúrbio genético recessivo do metabolismo dos aminoácidos e afeta perto de 1 em 48.000 recém-nascidos; curiosamente, os portadores apresentam sintomas quase idênticos àqueles provocados pelo envenenamento com o etilenoglicol.

Era fora de dúvida a impossibilidade da Sra. Stallings ter envenenado o seu segundo filho, mas a promotoria do Estado de Missouri não ficou impressionada pelos novos fatos e levou avante o julgamento dela. O juiz não permitiu que o diagnóstico de MMA da segunda criança fosse introduzido como evidência e, em janeiro de 1991, Patrícia Stallings foi condenada por ataque com arma mortal e sentenciada à prisão perpétua.

Entretanto para Patrícia, afortunadamente, Willian Sly, chefe do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, e James Schoemaker, chefe de um laboratório de pesquisa metabólica, ambos da Universidade de Saint Louis, ficaram interessados no seu caso quando dele souberam através de uma transmissão de televisão. Schoemaker reanalisou pessoalmente o sangue de Ryan e não detectou etilenoglicol. Então, ele e Sly contataram Piero Rinaldo, um especialista em doenças metabólicas da Escola de Medicina da Universidade de Yale, onde há um laboratório equipado para diagnosticar a MMA a partir de amostras de sangue.

Quando Rinaldo analisou o soro sangüíneo de Ryan, encontrou altas concentrações do ácido metilmalônico, um produto do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina e valina, que se acumula nos pacientes com MMA, porque a enzima que deve convertê-lo no próximo produto da via metabólica é inativa. E, segundo ele, de forma particularmente esclarecedora, a urina e o sangue da criança tinham grandes quantidades de substâncias cetônicas, outra conseqüência metabólica da doença. Como acontecera com Schoemaker, ele não encontrou etilenoglicol em uma amostra dos fluidos corporais da criança que morrera. O conteúdo da garrafa não pôde ser testado, porque se verificou que ela tinha desaparecido misteriosamente. As análises de Rinaldo convenceram-no de que Ryan tinha morrido de MMA, mas como explicar os resultados dos dois laboratórios que indicavam que o garoto tinha etilenoglicol em seu sangue? Eles estariam errados? "Assustador" foi o termo empregado por Rinaldo quando obteve e examinou os relatórios dos laboratórios. Um deles dizia que o sangue de Ryan Stallings continha etilenoglicol, apesar da análise da amostra de sangue não se equiparar com o perfil de uma amostra de sangue padronizada pelo próprio laboratório e que, sabidamente, continha etilenoglicol. "Isso não é um caso de interpretação questionável. A qualidade das análises deles era inaceitável", afirmou Rinaldo. E o segundo laboratório? De acordo com Rinaldo, aquele laboratório detectou um componente anormal no sangue de Ryan e, simplesmente, "assumiu que era etilenoglicol". As amostras da garrafa não revelaram nenhuma substância incomum, disse Rinaldo, apesar de o laboratório alegar evidências da presença de etilenoglicol também nela.

Rinaldo apresentou os seus resultados ao promotor do caso, George McElroy, que convocou uma conferência de imprensa no dia seguinte. "Eu não acredito mais nos resultados dos laboratórios", ele disse aos repórteres. Afinal, tendo concluído que Ryan Stallings morrera de MMA, McElroy retirou todas as acusações contra Patrícia Stallings, em 20 de setembro de 1991.

Por Michelle Hoffman (1991), *Science*, **253**, 931. Direitos autorais 1991 da Associação Americana para o Progresso da Ciência.

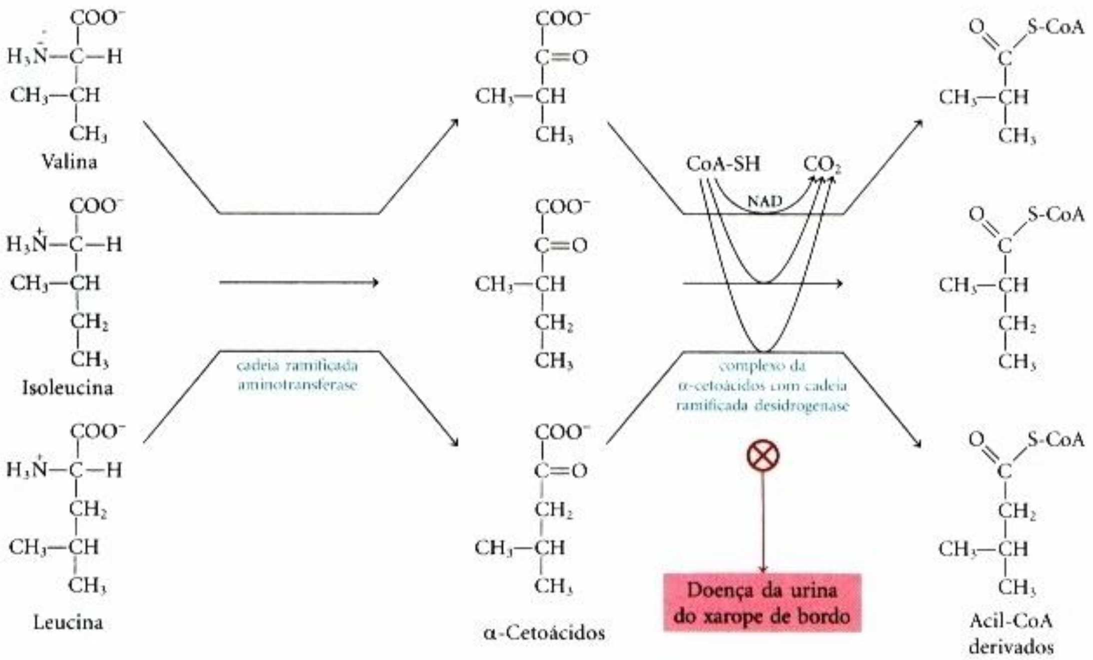

Valina
Isoleucina
Leucina
cadeia ramificada aminotransferase
α-Cetoácidos
CoA-SH
CO_2
NAD
complexo da α-cetoácidos com cadeia ramificada desidrogenase
Doença da urina do xarope de bordo
S-CoA
Acil-CoA derivados

Figura 18-27 – Vias catabólicas dos três aminoácidos de cadeia ramificada: valina, isoleucina e leucina. As três vias ocorrem nos tecidos extra-hepáticos e compartilham as duas primeiras enzimas. O complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada é análogo aos complexos da piruvato desidrogenase e do α-cetoglutarato e também requer os mesmos cinco cofatores (alguns são mostrados aqui). A enzima é defeituosa nas pessoas com doença da urina do xarope de bordo.

ácidos com cadeia ramificada é fosforilado por uma proteína quinase e, assim, inativado. A adição de um grande excesso dos aminoácidos de cadeia ramificada na dieta resulta de desfosforilação da enzima e sua conseqüente ativação. Lembre-se de que o complexo da piruvato desidrogenase está sujeito a uma regulação por fosforilação e por defosforilação similar (pág. 456).

Existe uma doença genética humana, relativamente rara, na qual esses três α-cetoácidos de cadeia ramificada (bem como seus aminoácidos precursores, especialmente a leucina) se acumulam no sangue e passam para a urina. Essa condição, que, se não for tratada, resulta em desenvolvimento anormal do cérebro, em retardo mental e freqüentemente em morte na primeira infância, é chamada de **doença da urina do xarope de bordo** devido ao odor característico dado à urina dessas pessoas pelos α-cetoácidos, resulta de um defeito no complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada. O tratamento médico dessa doença é feito por um controle muito rígido da dieta para limitar a ingestão de valina, de isoleucina e de leucina, ao mínimo necessário, para permitir um crescimento normal.

A asparagina e o aspartato são degradados até oxaloacetato

Em última instância, os esqueletos carbônicos da **asparagina** e do **aspartato** entram no ciclo do ácido cítrico por meio do oxaloacetato. A enzima **asparaginase** catalisa a hidrólise da asparagina para liberar aspartato, o qual sofre uma reação de transaminação com o α-cetoglutarato para produzir glutamato e oxaloacetato (Fig. 18-28).

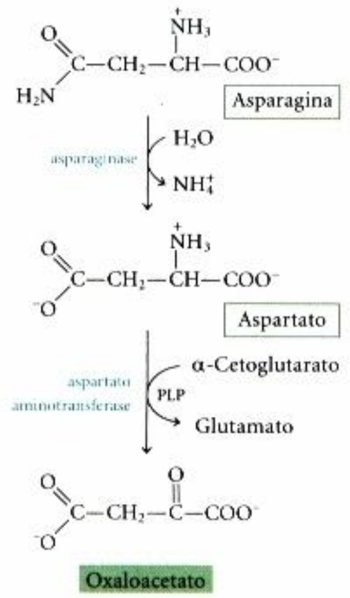

Asparagina
H_2O
asparaginase
NH_4^+
Aspartato
α-Cetoglutarato
aspartato aminotransferase
PLP
Glutamato
Oxaloacetato

Figura 18-28 – As vias catabólicas da asparagina e do aspartato. Os dois aminoácidos são convertidos em oxaloacetato.

Acabamos de ver como os 20 diferentes aminoácidos, depois de perder seus átomos de nitrogênio, são degradados por desidrogenação, por descarboxilação e por outras reações para liberar porções dos seus esqueletos carbônicos na forma de cinco metabólitos centrais que podem entrar no ciclo do ácido cítrico. Esses pedaços são degradados em acetil-CoA e completamente oxidados em CO_2 e em água, com a geração de ATP durante a fosforilação oxidativa. Fecharemos este capítulo com uma breve discussão de alguns destinos alternativos dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos.

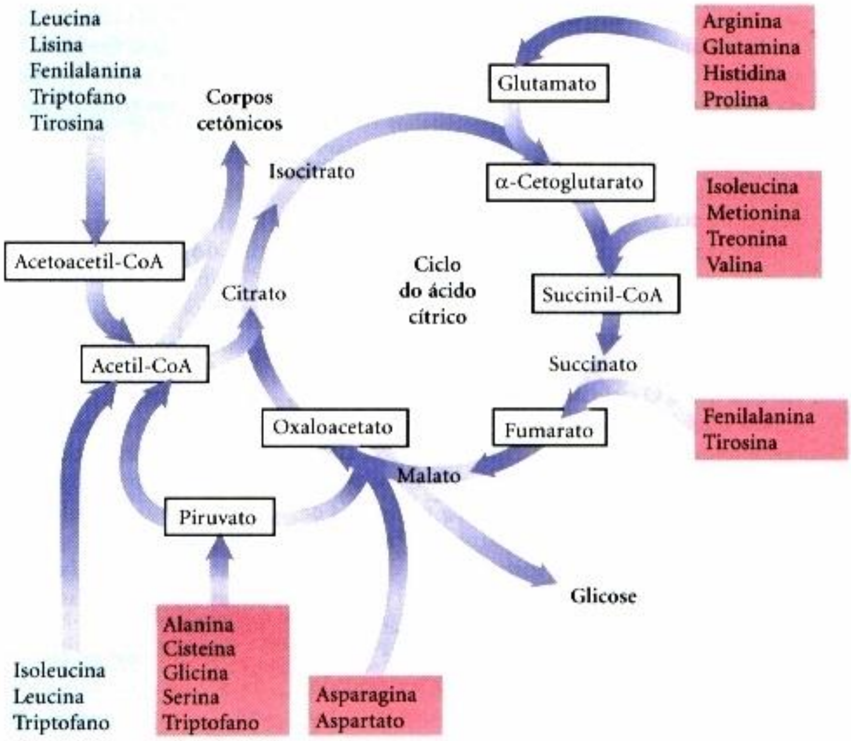

Leucina
Lisina
Fenilalanina
Triptofano
Tirosina
Corpos cetônicos
Isocitrato
Glutamato
Arginina
Glutamina
Histidina
Prolina
α-Cetoglutarato
Isoleucina
Metionina
Treonina
Valina
Acetoacetil-CoA
Citrato
Ciclo do ácido cítrico
Succinil-CoA
Acetil-CoA
Succinato
Oxaloacetato
Fumarato
Fenilalanina
Tirosina
Malato
Piruvato
Glicose
Alanina
Cisteína
Glicina
Serina
Triptofano
Isoleucina
Leucina
Triptofano
Asparagina
Aspartato

Figura 18-29 – Um resumo do metabolismo dos aminoácidos glicogênicos e cetogênicos. Note que quatro dos aminoácidos são tanto glicogênicos (sombreados em vermelho) quanto cetogênicos (sombreados em azul). Os cinco aminoácidos degradados até piruvato são também potencialmente cetogênicos. Apenas dois aminoácidos, leucina e lisina, são exclusivamente cetogênicos.

Alguns aminoácidos podem ser convertidos em glicose, outros em corpos cetônicos

Os seis aminoácidos, que são degradados até acetoacetil-CoA e/ou acetil-CoA: triptofano, fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina e lisina, podem liberar corpos cetônicos no fígado, pela conversão do acetoacetil-CoA em acetona e β-hidróxido butirato (veja Fig. 17-16). Esses aminoácidos são chamados de **cetogênicos** (Fig. 18-29). A sua capacidade para formar corpos cetônicos é particularmente evidente no diabetes melito não-tratado, durante o qual grandes quantidades de corpos cetônicos são produzidas pelo fígado, não apenas dos ácidos graxos, mas também dos aminoácidos cetogênicos.

Os aminoácidos que podem ser convertidos em piruvato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxaloacetato podem ser convertidos em glicose e glicogênio pelas vias descritas no Capítulo 20. Eles são chamados aminoácidos **glicogênicos**. A divisão entre aminoácidos cetogênicos e glicogênicos não é perfeita; quatro aminoácidos, triptofano, fenilalanina, tirosina e isoleucina, são tanto cetogênicos quanto glicogênicos. O catabolismo dos aminoácidos é particularmente importante para a sobrevivência de animais com dietas protéicas muito altas ou durante períodos de subnutrição. A leucina é um aminoácido exclusivamente cetogênico e é muito comum nas proteínas. Sua degradação faz uma contribuição substancial para a cetose em condições de subnutrição.

Resumo

Uma pequena fração da energia oxidativa, nos seres humanos, provém do catabolismo dos aminoácidos. Os aminoácidos são derivados da hidrólise (reciclagem) das proteínas celulares, da degradação das proteínas ingeridas na alimentação, ou da quebra das proteínas corporais, na falta de outras fontes de combustíveis durante o jejum ou do diabetes melito não-tratado. As proteínas ingeridas são degradadas por proteases, no estômago e no intestino delgado. A maioria dessas proteases é inicialmente sintetizada como zimogênios inativos, que são ativados no estômago ou no intestino pela remoção proteolítica de partes de suas cadeias polipeptídicas.

Um passo precoce no catabolismo dos aminoácidos é a separação do grupo amino do esqueleto carbônico. Na maioria dos casos, o grupo amino é transferido para o α-cetoglutarato para formar glutamato. Esse tipo de reação é chamado de transaminação e requer a coenzima piridoxal fosfato. O glutamato é transportado para mitocôndrias do fígado, onde um grupo amino é liberado como amônia (NH_4^+) pela enzima glutamato desidrogenase. A amônia, formada em outros tecidos, é transportada até as mitocôndrias do fígado como o nitrogênio amida da glutamina ou como o grupo amino da alanina. A maior porção dessa alanina é gerada nos músculos e transportada no sangue até o fígado. Essa alanina sofre desaminação, e o piruvato resultante é convertido em glicose, que é transportada de volta ao músculo como parte do ciclo glicose-alanina.

A amônia é muito tóxica para os tecidos animais. No ciclo da uréia, a ornitina combina com a amônia na forma de carbamil fosfato para formar a citrulina. Um segundo grupo amino, provindo do aspartato, é transferido para a citrulina para formar a arginina — o precursor imediato da uréia. A arginase hidrolisa a arginina para formar uréia e ornitina; assim, a ornitina é ressintetizada a cada volta do ciclo da uréia. O ciclo da uréia resulta em uma conversão líquida do oxaloacetato em fumarato, ambos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Dessa forma, esses dois ciclos são interconectados. A atividade do ciclo da uréia é regulada nos níveis de síntese enzimática e de regulação alostérica da enzima que forma o carbamil fosfato.

Depois da remoção dos grupos amino por transaminação, os esqueletos carbônicos dos aminoácidos sofrem oxidação em compostos que podem entrar no ciclo do ácido cítrico para ser oxidados até CO_2 e H_2O. Nessas vias, os co-fatores tetraidrofolato e *S*-adenosilmetionina facilitam as reações de transferência de unidades monocarbônicas e o cofator tetraidrobiopterina facilita a oxidação da fenilalanina catalisada pela fenilalanina hidroxilase. Existem cinco intermediários por meio dos quais os esqueletos carbônicos dos aminoácidos entram no ciclo do ácido cítrico: acetil-CoA; α-cetoglutarato; succinil-CoA; fumarato e oxaloacetato. Os aminoácidos que podem produzir acetil-CoA são divididos em dois grupos. Alanina, cisteína, glicina, triptofano e serina produzem acetil-CoA via piruvato; a leucina, lisina, fenilalanina, tirosina e triptofano produzem acetil-CoA via acetoacetil-CoA. A isoleucina, leucina e triptofano também formam acetil-CoA diretamente. Prolina, histidina, arginina, glutamina e glutamato entram no ciclo do ácido cítrico por meio do α-cetoglutarato; treonina, metionina, isoleucina e valina entram por meio do succinil-CoA; os quatro átomos de carbono da fenilalanina e da tirosina entram por meio do fumarato; a asparagina e o aspartato entram via oxaloacetato. Os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), diferentemente de outros aminoácidos, são degradados nos tecidos extra-hepáticos. Um certo número de doenças humanas graves pode ser atribuído a defeitos genéticos, que envolvem enzimas específicas das vias de catabolismo dos aminoácidos.

Dependendo de seus produtos finais de degradação, alguns aminoácidos podem ser convertidos em corpos cetônicos; alguns podem ser convertidos em glicose; alguns em ambos. Essas vias metabólicas integram a degradação dos aminoácidos no metabolismo intermediário e podem ser críticas para a sobrevivência sob condições nas quais os aminoácidos são uma fonte significativa de energia metabólica.

Leitura Adicional

Geral

Bender DA. (1985) *Amino Acid Metabolism*, 2nd edn, Wiley-Interscience, Inc., New York.

Campbell JW. (1991) Excretory nitrogen metabolism. In *Environmental and Metabolic Animal Physiology*, 4th edn (Prosser CL, ed), pp. 277-324, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Coomes MW. (1997) Amino acid metabolism. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 4th edn (Devlin TM, ed) pp. 445-488, Wiley-Liss, New York.

Hayashi H. (1995) Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J. Biochem.* **118**, 463-473.

Mazelis M. (1980) Amino acid catabolism. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* (Stumpf PK & Conn EE, eds), Vol. 5: *Amino Acids and Derivatives* (Miflin BJ, ed), pp. 541-567, Academic Press, Inc., New York.

Uma discussão sobre os vários destinos dos aminoácidos nos vegetais.

Powers-Lee SG & Meister A. (1988) Urea synthesis and ammonia metabolism. In *The Liver: Biology and Pathobiology*, 2nd edn (Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D & Shafritz DA, eds), pp. 317-329, Raven Press, New York.

Walsh C. (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Uma excelente fonte para uma discussão em profundidade das classes de mecanismos de reação descritas neste capítulo.

Metabolismo dos aminoácidos

Christen P & Metzler DE. (1985) *Transaminases*, Wiley-Interscience, Inc., New York.

Curthoys NP & Watford M. (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 133-159.

Fitzpatrick PF. (1999) Tetrahidropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 355-382.

O ciclo da uréia

Holmes FL. (1980) Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed. Proc.* **39**, 216-225.

Um historiador da Medicina reconstrói os acontecimentos que conduziram à descoberta do ciclo da uréia.

Kirsch JF, Eichele G, Ford GC, Vincent MG, Jansonius JN, Gehring H, & Christen P. (1984) Mechanism of action of aspartate amino-transferase proposed on the basis of its spatial structure. *J. Mol. Biol.* **174**, 497-525.

Alterações patológicas na degradação bioquímica dos aminoácidos

Ledley FD, Levy HL, & Woo SLC. (1986) Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia in families with both disorders. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1276-1280.

Nyhan WL. (1984) *Abnormalities in Amino Acid Metabolism in Clinical Medicine*, Appleton-Century-Crofts, Norwalk, CT.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, & Valle D. (eds) (1995) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th edn, Part 5: *Amino Acids*, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

Scriver CR, Kaufman S, & Woo SLC. (1988) Mendelian hyperphenylalaninemia. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 301-321.

Problemas

1. Produtos da transaminação dos aminoácidos. Desenhe a estrutura e escreva os nomes dos α-cetoácidos resultantes, quando os seguintes aminoácidos sofrem transaminação com o α-cetoglutarato: (a) aspartato, (b) glutamato, (c) alanina, (d) fenilalanina.

2. Medida da velocidade de reação da alanina aminotransferase. A atividade (velocidade da reação) da alanina aminotransferase é usualmente medida, incluindo-se um excesso de lactato desidrogenase pura e de NADH no sistema de reação. A velocidade do desaparecimento da alanina é igual à velocidade do desaparecimento do NADH medido espectrofotometricamente. Explique as bases de funcionamento desse teste.

3. Distribuição do nitrogênio do grupo amino. Se a sua alimentação for rica em alanina, mas pobre em aspartato, você apresentará sinais de deficiência em aspartato? Explique.

4. Um defeito genético no metabolismo dos aminoácidos: história de um caso. Uma criança de dois anos de idade foi levada ao hospital. Sua mãe informou que ela vomitava freqüentemente, especialmente após as refeições. A massa corporal da criança e o seu desenvolvimento físico eram abaixo do normal. Seus cabelos, embora escuros, continham porções de cabelos brancos. Uma amostra da urina tratada com solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) apresentou cor verde, característica da presença de fenilpiruvato. A análise quantitativa de amostras de urina apresentou os resultados mostrados na tabela a seguir.

Substância	Concentração (mM)	
	Urina do paciente	Urina normal
Fenilalanina	7,0	0,01
Fenilpiruvato	4,8	0
Fenilactato	10,3	0

(a) Sugira que enzima possa estar deficiente nessa criança. Proponha um tratamento para essa condição.

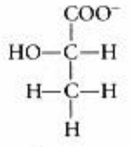
(b) Por que a fenilalanina aparece na urina em grandes quantidades?

(c) Qual é a fonte do fenilpiruvato e do fenilactato? Por que essas vias (normalmente não-funcionais) entram em ação quando a concentração da fenilalanina se eleva?

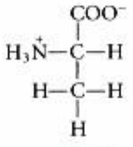
(d) Por que o cabelo dessa criança apresenta mechas brancas?

5. Papel da cobalamina no catabolismo dos aminoácidos. A anemia perniciosa é causada pela redução da absorção da vitamina B_{12}. Qual o efeito dessa redução no catabolismo dos aminoácidos? Todos os aminoácidos são afetados igualmente? (Indicação: veja o Adendo 17-2).

6. Lactato *versus* alanina como combustível metabólico: o custo da remoção do nitrogênio. Os três carbonos do lactato e da alanina possuem estados de oxidação idênticos e os animais podem usar qualquer uma das duas fontes de carbono como combustível metabólico. Compare a produção líquida de ATP (moles de ATP por mol de substrato) para a oxidação completa (até CO_2 e H_2O) do lactato e da alanina quando é incluído o custo da excreção na forma de uréia:

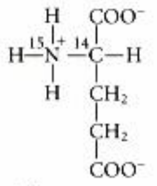


Lactato



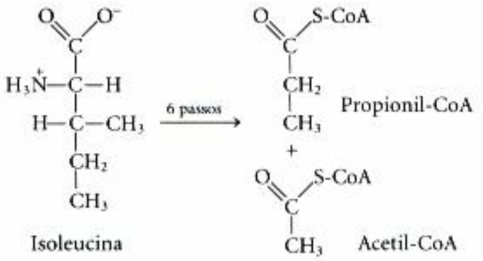
Alanina

7. Via do carbono e do nitrogênio no metabolismo do glutamato. Quando o glutamato [2-^{14}C,^{15}N] sofre degradação oxidativa no fígado de um rato, em que átomos dos seguintes metabólitos serão encontrados cada isótopo? (a) uréia, (b) succinato, (c) arginina, (d) citrulina, (e) ornitina, (f) aspartato.

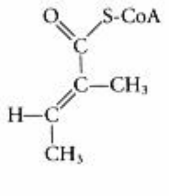


Glutamato

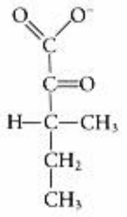
8. Estratégia química do catabolismo da isoleucina. A isoleucina é degradada por uma série de seis etapas até propionil-CoA e acetil-CoA, como mostrado a seguir:



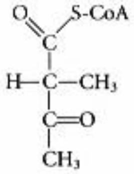
(a) O processo químico da degradação da isoleucina consiste em estratégias análogas àquelas encontradas no ciclo do ácido cítrico e na β-oxidação dos ácidos graxos. Os intermediários envolvidos na degradação da isoleucina (I a V), mostrados abaixo, não estão na ordem apropriada. Use o seu conhecimento e compreensão do ciclo do ácido cítrico e da via de β-oxidação dos ácidos graxos para arranjar os intermediários na seqüência metabólica apropriada para a degradação da isoleucina:



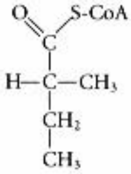
I



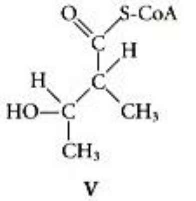
II



III



IV



V

(b) Para cada etapa proposta anteriormente, descreva o processo químico, forneça um exemplo análogo a partir do ciclo do ácido cítrico ou da via da β-oxidação (quando possível) e indique os co-fatores, quando necessários:

9. Intoxicação por amônia resultante de dieta com deficiência de arginina. Em um estudo realizado alguns anos atrás, depois de jejum por uma noite, alguns gatos receberam uma única refeição de uma dieta de aminoácidos completa, mas sem arginina. Dentro de 2 horas, os níveis de amônia sangüíneos aumentaram de um nível normal de 18μg/litro para 140μg/litro e os gatos apresentaram sintomas clínicos de intoxicação pela amônia. Um grupo controle alimentado com uma dieta completa de aminoácidos ou com uma dieta de aminoácido, em que a arginina foi substituída pela ornitina, não apresentou nenhum sintoma clínico anormal:

(a) Qual era o papel do jejum nesse experimento?

(b) O que induziu o aumento dos níveis de amônia? Por que a ausência de arginina levou à intoxicação pela amônia? A arginina é um aminoácido essencial nos gatos? Justifique sua resposta.

(c) Por que a ornitina pode substituir a arginina?

10. Oxidação do glutamato. Escreva uma série de equações balanceadas e a reação final líquida, descrevendo a oxidação de 2 moles de glutamato em 2 moles de α-cetoglutarato mais 1 mol de uréia excretada.

11. O papel do piridoxal fosfato no metabolismo da glicina. A enzima serina hidroximetil transferase (veja Fig. 18-19) necessita do piridoxal fosfato como co-fator. Proponha um mecanismo para essa reação que explique essa necessidade. (Indicação: veja Fig. 18-6.)

12. Vias paralelas para a degradação de aminoácidos e ácidos graxos. O esqueleto carbônico da leucina é degradado por uma série de reações análogas àquelas do ciclo do ácido cítrico e da β-oxidação dos ácidos graxos. Para cada reação marcada de (a) até (f), indique seu tipo, forneça um exemplo análogo no ciclo do ácido cítrico ou na β-oxidação (quando possível) e assinale qualquer co-fator necessário.

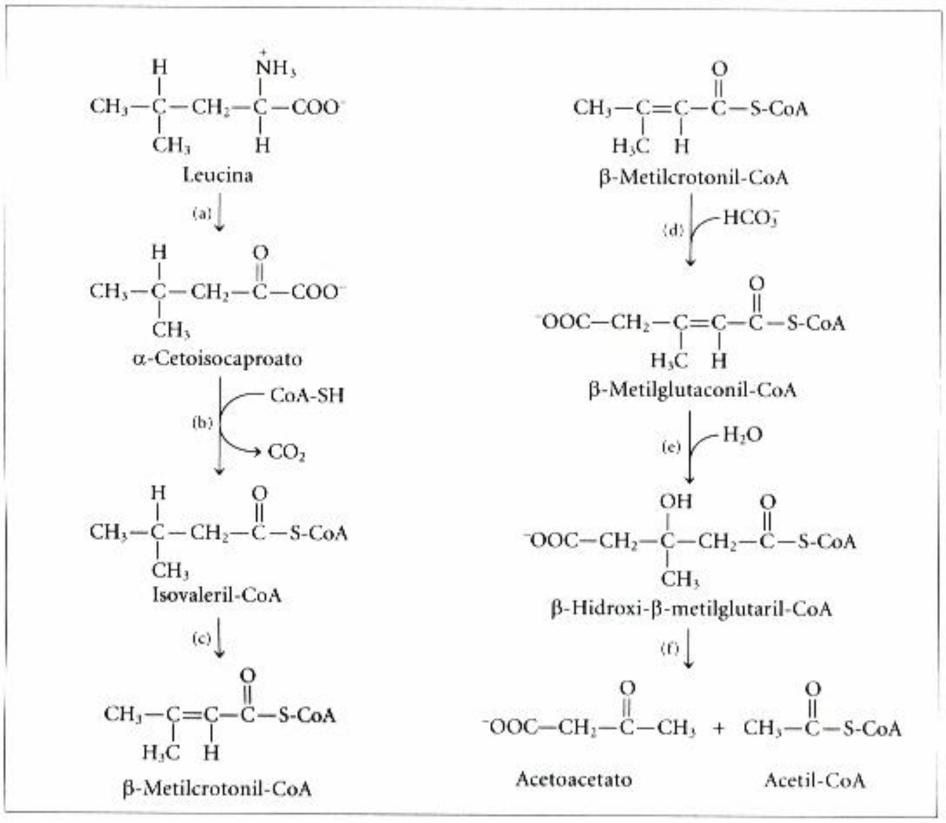
13. O ciclo da uréia e as reações de transaminação. A aspartato aminotransferase tem a maior atividade de todas as aminotransferases no fígado dos mamíferos. Por quê?

14. As razões bioquímicas contrárias à dieta de proteínas líquidas. Uma dieta para a redução de massa corporal, ativamente propagandeada alguns anos atrás, exigia a ingestão diária de "proteína líquida" (uma sopa comercial de gelatina hidrolisada), água e um complemento de vitaminas. Todos os demais alimentos e líquidos deveriam ser evitados. Tipicamente, as pessoas, nessa dieta, perdem ao redor de quatro a seis quilos na primeira semana.

(a) Os opositores dessa conduta argumentam que a perda de peso é quase que inteiramente de água e será recuperada quase que imediatamente quando uma dieta normal for reimplantada. Qual é a base bioquímica dessa argumentação?

(b) Um certo número entre as pessoas que se dispuseram a cumprir essa dieta morreu durante ela. Quais são alguns dos perigos inerentes a essa dieta e como podem conduzir à morte?

15. Alanina e glutamina no sangue. O plasma sangüíneo contém todos os aminoácidos necessários para a síntese das proteínas corporais, entretanto eles não estão presentes em concentrações iguais. No plasma sangüíneo humano, dois aminoácidos, alanina e glutamina, estão presentes em concentrações muito maiores do que todos os demais aminoácidos. Sugira as possíveis razões para esse fato.



CAPÍTULO 19

Fosforilação Oxidativa e Fotofosforilação

A fosforilação oxidativa é o estágio final do metabolismo produtor de energia nos organismos aeróbicos. Todas as etapas oxidativas na degradação dos carboidratos, gorduras e aminoácidos convergem para esse estágio final da respiração celular, no qual a energia proveniente da oxidação é responsável pela síntese de ATP. A fotofosforilação é o meio pelo qual os organismos fotossintéticos capturam a energia da luz solar — a fonte fundamental de energia na biosfera — e a usam para produzir ATP. A fosforilação oxidativa e a fotofosforilação, em conjunto, são responsáveis pela maioria do ATP sintetizado por vários organismos aeróbicos na maior parte do tempo.

Nos eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias e a fotofosforilação nos cloroplastos. A fosforilação oxidativa envolve a *redução* do O_2 a H_2O com elétrons doados pelo NADH e $FADH_2$, e ocorre igualmente na presença de luz ou na escuridão. A fotofosforilação envolve a *oxidação* da H_2O a O_2, em que o $NADP^+$ é o aceptor de elétrons e absolutamente dependente da energia luminosa. Apesar das diferenças, esses dois processos conversores de energia, altamente eficientes, apresentam mecanismos fundamentalmente semelhantes.

Nosso entendimento atual da síntese do ATP na mitocôndria e nos cloroplastos está baseado na hipótese, introduzida por Peter Mitchell, em 1961, de que as diferenças na concentração transmembrana de prótons são os reservatórios para a energia extraída das reações de oxidação biológicas. Essa **teoria quimiosmótica** tem sido aceita como um dos grandes princípios unificadores da biologia no século XX. Ela permite a compreensão dos processos de fosforilação oxidativa e fotofosforilação e para transduções de energia aparentemente distintas, tais como o transporte ativo através de membranas e o movimento dos flagelos das bactérias.

A fosforilação oxidativa e a fotofosforilação são mecanisticamente similares em três aspectos: (1) Ambos os processos envolvem o fluxo de elétrons por meio de uma cadeia de transportadores ligados à membrana. (2) A energia livre, disponível por meio desse fluxo de elétrons "morro abaixo" (exergônico), está acoplada ao transporte de prótons "morro acima", por meio de uma membrana impermeável ao próton, conservando a energia livre da oxidação dos combustíveis como um potencial eletroquímico transmembrana (pág. 316). (3) O fluxo transmembrana de prótons, no sentido do seu gradiente de concentração por meio de canais protéicos específicos, fornece a energia livre para a síntese do ATP, que é catalisada por um complexo protéico ligado à membrana (ATP sintase) e que acopla o fluxo de prótons à fosforilação do ADP.

Este capítulo começa com a fosforilação oxidativa. Inicialmente, serão descritos os componentes da cadeia de transporte de elétrons, a sua organização em grandes complexos funcionais na membrana interna da mitocôndria, a seqüência do fluxo de elétrons por meio deles e os movimentos de prótons que acompanham esse fluxo. O próximo tópico é o notável complexo enzimático que, por meio da "catálise rotacional", captura a energia do fluxo de prótons na forma de ATP. Então, serão considerados os mecanismos regulatórios que coordenam a fosforilação oxidativa por várias vias catabólicas que oxidam combustíveis. Com esse entendimento da fosforilação oxidativa mitocondrial, será abordada então a fotofosforilação, começando com a absorção da luz por pigmentos fotossintéticos, seguido pelo fluxo de elétrons, direcionado pela luz, da H_2O para o $NADP^+$, e a base molecular para o acoplamento do fluxo de elétrons e prótons. Finalmente, serão abordadas as similaridades de estrutura e mecanismo entre as ATP sintases dos cloroplastos e mitocôndrias, bem como as bases evolutivas para essa conservação do mecanismo.

FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Reações de Transferência de Elétrons na Mitocôndria

A descoberta, em 1948, por Eugene Kennedy e Albert Lehninger, de que as mitocôndrias são os sítios da fosforilação oxidativa nos eucariotos, marcou o início da fase moderna dos estudos das transduções de energia biológica. As mitocôndrias, tais como as bactérias gram-negativas, possuem duas membranas (Fig. 19-1). A membrana mitocondrial externa é facilmente permeável a pequenas moléculas (M_r <5.000) e íons que se movem livremente através de canais transmembrana formados por uma família de proteínas integrais de membrana chamadas porinas. A membrana interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e de íons, incluindo prótons (H^+). As únicas espécies que atravessam a membrana interna são aquelas para as quais existem transportadores específicos. A membrana interna contém os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase.

Albert L. Lehninger
(1917-1986)

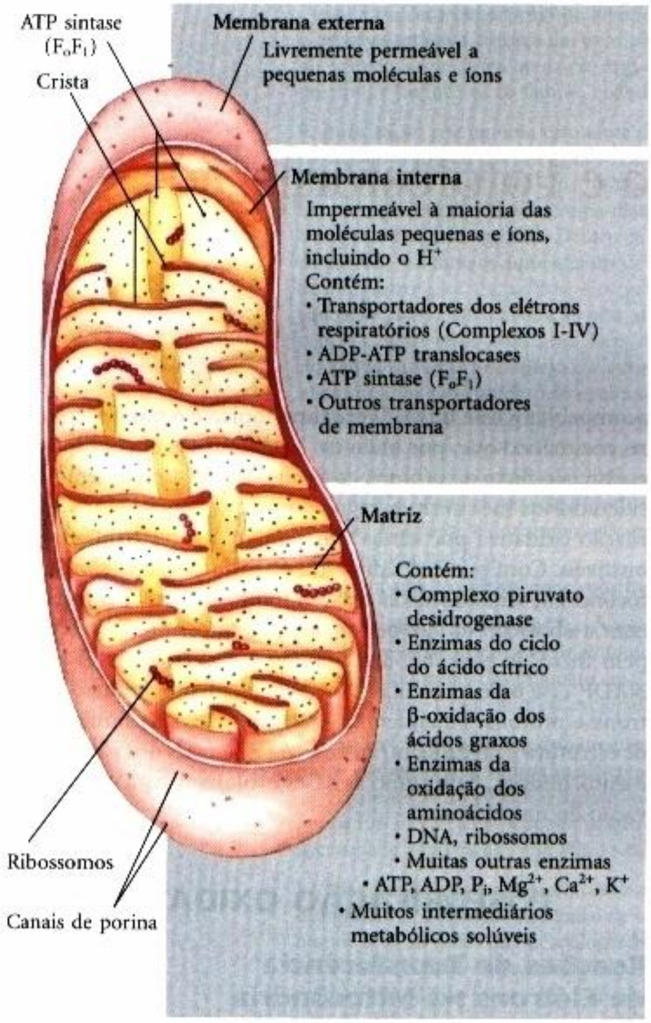

ATP sintase (F_oF_1)
Crista
Membrana externa
Livremente permeável a pequenas moléculas e íons
Membrana interna
Impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo o H^+
Contém:
• Transportadores dos elétrons respiratórios (Complexos I-IV)
• ADP-ATP translocases
• ATP sintase (F_oF_1)
• Outros transportadores de membrana
Matriz
Contém:
• Complexo piruvato desidrogenase
• Enzimas do ciclo do ácido cítrico
• Enzimas da β-oxidação dos ácidos graxos
• Enzimas da oxidação dos aminoácidos
• DNA, ribossomos
• Muitas outras enzimas
• ATP, ADP, P_i, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+
• Muitos intermediários metabólicos solúveis
Ribossomos
Canais de porina

Figura 19-1 – Anatomia bioquímica de uma mitocôndria. As circunvoluções (cristas) da membrana interna proporcionam uma superfície muito grande. A membrana interna de uma única mitocôndria do fígado pode ter mais de 10.000 conjuntos de sistemas de transferência de elétrons (cadeias respiratórias) e moléculas de ATP sintase, distribuídas sobre toda a superfície da membrana. Mitocôndrias do coração, que apresentam cristas muito abundantes e, portanto, uma área de membrana interna muito maior, contêm cerca de três vezes mais conjuntos de sistemas de transferência de elétrons que as mitocôndrias do fígado. O reservatório mitocondrial das coenzimas e intermediários está funcionalmente separado do reservatório citoplasmático. As mitocôndrias dos invertebrados, plantas e microrganismos eucariotos são semelhantes às mostradas aqui, embora haja muita variação no tamanho, na forma e no grau de enrolamento da membrana interna. Veja o Capítulo 2 (págs. 28-29) para outros detalhes da estrutura mitocondrial.

A matriz mitocondrial, cercada pela membrana interna, contém o complexo da piruvato desidrogenase, e as enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via da β-oxidação dos ácidos graxos e as vias de oxidação dos aminoácidos. Em resumo, ela contém todas as vias da oxidação dos combustíveis, exceto a glicólise, que ocorre no citosol. A membrana interna, seletivamente permeável, segrega os intermediários e as enzimas das vias metabólicas citosólicas por meio de processos metabólicos que ocorrem na matriz. Entretanto, transportadores específicos carregam piruvato, ácidos graxos e aminoácidos ou seus derivados α-ceto para o interior da matriz, garantindo o acesso à maquinaria do ciclo do ácido cítrico. Semelhantemente, o ADP e o P_i são transportados especificamente para o interior da matriz à medida que o ATP recém-sintetizado é transportado para fora.

Os elétrons são canalizados para transportadores universais de elétrons

A fosforilação oxidativa começa com a entrada de elétrons na cadeia respiratória. Muitos desses elétrons são provenientes da ação de desidrogenases que coletam elétrons das vias catabólicas e os canalizam para aceptores universais de elétrons — nucleotídeos de nicotinamida (NAD^+ ou $NADP^+$) ou nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD).

Desidrogenases associadas a nucleotídeo de nicotinamida catalisam reações reversíveis dos seguintes tipos gerais:

$$\text{Substrato reduzido} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{substrato oxidado} + NADH + H^+$$

$$\text{Substrato reduzido} + NADP^+ \rightleftharpoons \text{substrato oxidado} + NADPH + H^+$$

A maioria das desidrogenases que atuam no catabolismo é específica para o NAD^+ como receptor de elétrons (Tabela 19-1). Algumas estão no citosol, outras nas mitocôndrias e outras ainda apresentam isoenzimas citosólica e mitocondrial.

As desidrogenases ligadas ao NAD removem dois átomos de hidrogênio dos seus substratos. Um deles é transferido como um íon hidreto ($:H^-$) ao NAD^+ e o outro é liberado como H^+ no meio (veja Fig. 14-15). O NAD^+ também pode coletar equivalentes redutores de substratos trabalhados pelas desidrogenases ligadas ao NADP. Isso é possível devido à **nicotinamida nucleotídeo transidrogenase**, que catalisa a reação:

$$NADPH + NAD^+ \rightleftharpoons NADP^+ + NADH$$

O NADH e o NADPH são transportadores de elétrons hidrossolúveis que se associam *reversivelmente* com as desidrogenases. O NADH carrega os elétrons derivados das reações catabólicas até o seu ponto de entrada na cadeia respiratória, o complexo da NADH desidrogenase, descrito a seguir. O NADPH geralmente fornece elétrons para as reações anabólicas. Nem o NADH nem o NADPH podem atravessar a membrana interna da mitocôndria, mas os elétrons que elas carregam podem ser lançados através dela, como será visto adiante.

As **flavoproteínas** apresentam um nucleotídeo flavina, o FMN ou o FAD, fortemente ligado, às vezes até covalentemente (veja Fig. 14-16). O nucleotídeo de flavina oxidado pode aceitar um elétron (dando origem a uma forma semiquinona) ou dois (originando $FADH_2$ ou $FMNH_2$). A transferência de elétrons ocorre porque a flavoproteína tem um potencial de redução maior que o do composto oxidado. O potencial de redução padrão de um nucleotídeo de flavina, diferente daquele do NAD ou NADP, depende da proteína à qual ele está associado. Interações locais com grupos funcionais na proteína distorcem os orbitais dos elétrons no anel da flavina, alterando as estabilidades relativas das formas oxidadas e reduzidas. Assim, o potencial de redução padrão relevante é o da flavoproteína específica, e não o do FAD ou FMN isolado. O nucleotídeo de flavina deveria ser considerado parte do sítio ativo das flavoproteínas, e não um reagente ou produto na reação de transferência de elétrons. Como as flavoproteínas podem participar tanto na transferência de um como de dois elétrons, elas podem funcionar como intermediárias entre reações em que dois elétrons são doados (como nas desidrogenações) e aquelas em que um elétron é aceito (como na redução de uma quinona a hidroquinona, descrita a seguir).

Os elétrons passam por uma série de transportadores ligados à membrana

A cadeia respiratória mitocondrial consiste em uma série de transportadores de elétrons que atuam seqüencialmente, a maioria dos quais são proteínas integrais de membrana que apresen-

Tabela 19-1 – Algumas reações importantes catalisadas por desidrogenases ligadas ao NAD(P)H

Reação*	Localização†
Ligadas ao NAD	
α-Cetoglutarato + CoA + $NAD^+ \rightleftharpoons$ succinil-CoA + CO_2 + NADH + H^+	M
L-Malato + $NAD^+ \rightleftharpoons$ oxaloacetato + NADH + H^+	M e C
Piruvato + CoA + $NAD^+ \rightleftharpoons$ acetil-CoA + CO_2 + NADH + H^+	M
Gliceraldeído-3-fosfato + P_i + $NAD^+ \rightleftharpoons$ 1,3-difosfoglicerato + NADH + H^+	C
Lactato + $NAD^+ \rightleftharpoons$ piruvato + NADH + H^+	C
β-Hidroxiacil-CoA + $NAD^+ \rightleftharpoons$ β-cetoacil-CoA + NADH + H^+	M
Ligada ao NADP	
Glicose-6-fosfato + $NADP^+ \rightleftharpoons$ 6-fosfogluconato + NADPH + H^+	C
Ligadas ao NAD ou NADP	
L-Glutamato + H_2O + $NAD(P)^+ \rightleftharpoons$ α-cetoglutarato + NH_4^+ + NAD(P)H	M
Isocitrato + $NAD(P)^+ \rightleftharpoons$ α-cetoglutarato + CO_2 + NAD(P)H + H^+	M e C

*Estas reações e suas enzimas foram discutidas nos Capítulos 15 a 18.
†M designa mitocôndria; C, citosol.

tam grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons. Na fosforilação oxidativa, ocorrem três tipos de transferência de elétrons: (1) **transferência direta de elétrons**, tal como na redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}; (2) **transferência como um átomo de hidrogênio** ($H^+ + e^-$); e (3) **transferência como um íon hidreto** ($:H^-$), que possui dois elétrons. O termo **equivalente redutor** é usado para designar um único equivalente de elétron transferido na reação de oxirredução.

Além do NAD e das flavoproteínas, três outros tipos de moléculas transportadoras de elétrons funcionam na cadeia respiratória: uma quinona hidrofóbica (ubiquinona) e dois tipos diferentes de proteínas que contêm ferro (citocromos e proteínas ferro-enxofre).

A **ubiquinona** (também chamada de **coenzima Q**, ou simplesmente **Q**) é uma benzoquinona lipossolúvel que apresenta uma longa cadeia lateral isoprenóide (Fig. 19-2). A plastoquinona (encontrada nos cloroplastos das plantas) e a menaquinona (encontrada nas bactérias) são compostos muito parecidos e desempenham papéis análogos ao da ubiquinona, transportando elétrons por cadeias de transferência de elétrons associadas à membrana. A ubiquinona pode aceitar um elétron, originando o radical semiquinona ($QH^{\bullet}$), ou dois elétrons para formar ubiquinol (QH_2) (Fig. 19-2). Semelhantemente aos transportadores flavoproteínas, ela deve atuar na junção entre um doador de dois elétrons e um receptor de um elétron. Como a ubiquinona é pequena e hidrofóbica, ela se difunde livremente na camada lipídica da membrana interna mitocondrial e pode transportar equivalentes redutores entre outros transportadores de elétrons menos móveis na membrana. Como carrega tanto prótons quanto elétrons, ela desempenha um papel central no acoplamento do fluxo de elétrons ao movimento de prótons.

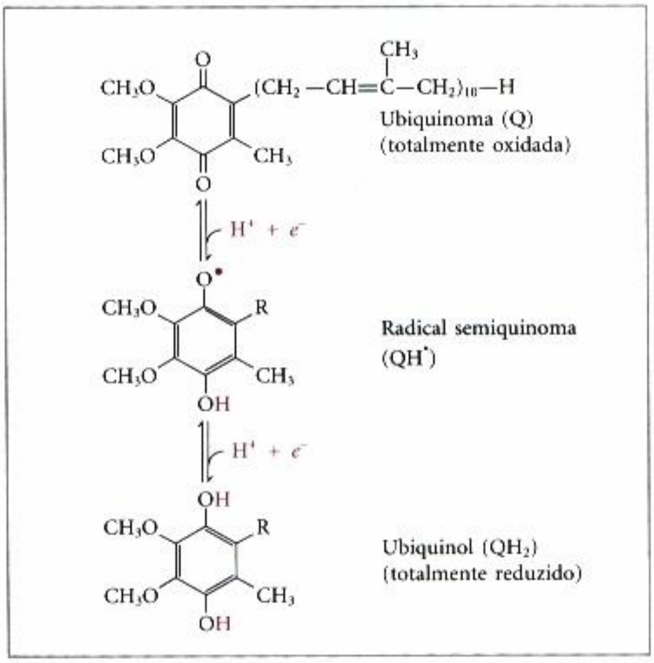
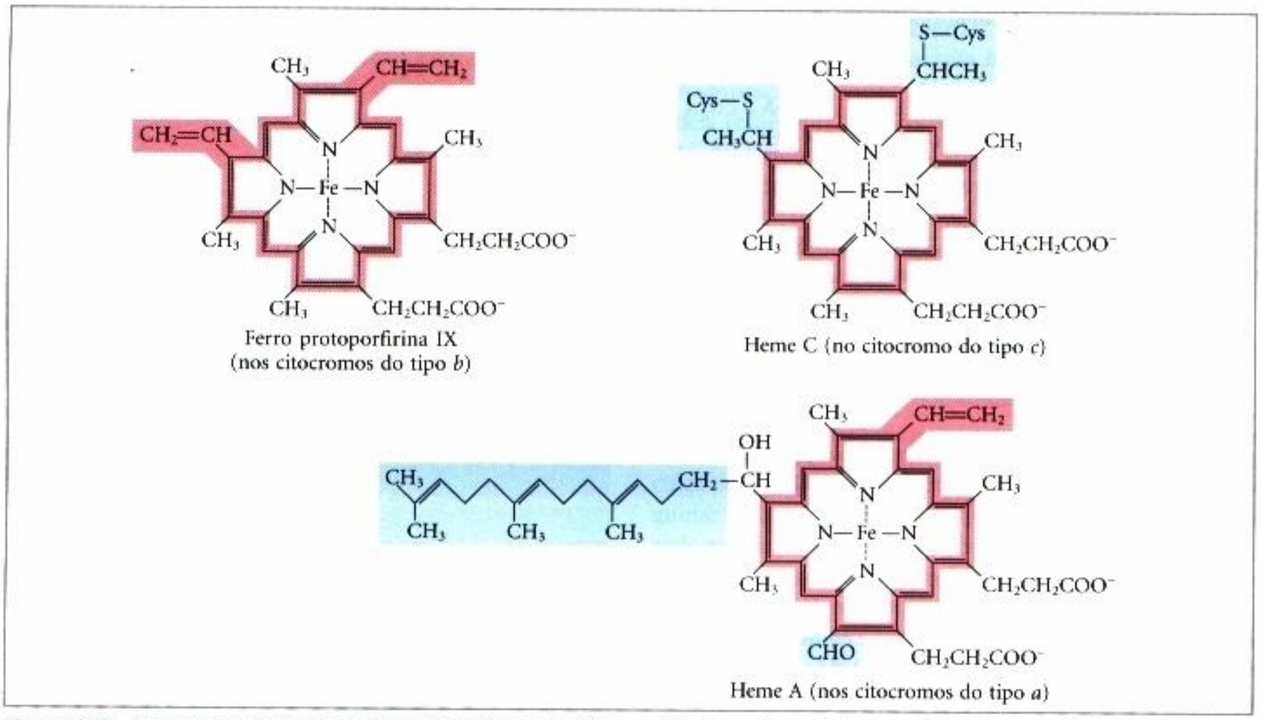


Figura 19-2 – Ubiquinona (Q, ou coenzima Q). A redução completa da ubiquinona requer dois elétrons e dois prótons e ocorre em duas etapas por meio de um intermediário radicalar semiquinona.

Os **citocromos** são proteínas que apresentam como característica uma intensa absorção da luz, devido aos seus grupos prostéticos heme, que contêm ferro (Fig. 19-3). As mitocôndrias contêm três classes de citocromos designados por *a*, *b* e *c*, que podem ser distinguidos por diferenças nos seus espectros de absorção de luz. Cada tipo de citocromo, no seu estado reduzido (Fe^{2+}), possui três bandas de absorção na região do visível (Fig. 19-4). A banda de maior comprimento de onda está próxima de 600nm, nos citocromos do tipo *a*; próxima de 560nm, no tipo *b*; e próxima de 550nm, no tipo *c*. Para se distinguir entre citocromos muito parecidos de um tipo, algumas vezes, usa-se o valor exato do máximo de absorção nos seus nomes, como no citocromo b_{562}.

Os co-fatores heme dos citocromos *a* e *b* estão fortemente, mas não-covalentemente, ligados às suas proteínas associadas; os grupos heme dos citocromos do tipo *c* estão ligados covalentemente por meio de resíduos de Cys (Fig. 19-3). Similarmente às flavoproteínas, o potencial de redução padrão do átomo de ferro no heme de um citocromo depende da sua interação com as cadeias laterais da proteína e, portanto, é diferente para cada citocromo. Os citocromos do tipo *a* e *b* e alguns do tipo *c* são proteínas integrais da membrana interna da mitocôndria. Uma notável exceção é o citocromo *c* da mitocôndria, uma proteína solúvel que se associa com a superfície externa da membrana interna da mitocôndria por meio de interações eletrostáticas. Nós abordamos o citocromo *c* nas discussões iniciais sobre a evolução das proteínas (veja Adendo 5-2) e a estrutura de proteína (veja Fig. 6-18a).

Nas **proteínas ferro-enxofre**, inicialmente descobertas por Helmut Beinert, o ferro está presente não no heme, mas associado a átomos de enxofre inorgânico ou a átomos de enxofre de resíduos de Cys na proteína, ou a ambos. Esses centros de ferro-enxofre (Fe-S) variam desde estruturas simples, com um único átomo de Fe coordenado a quatro grupos Cys—SH, até centros Fe-S mais complexos com dois ou quatro átomos de Fe (Fig.



Ferro protoporfirina IX
(nos citocromos do tipo *b*)

Heme C (no citocromo do tipo *c*)

Heme A (nos citocromos do tipo *a*)

Figura 19-3 – Grupos prostéticos dos citocromos. Cada um deles consiste de quatro anéis de cinco átomos, contendo nitrogênio em uma estrutura cíclica chamada de porfirina. Os quatro átomos de nitrogênio estão coordenados com um íon Fe central que pode estar na forma Fe^{2+} ou Fe^{3+}. A ferro protoporfirina IX é encontrada nos citocromos do tipo *b*, na hemoglobina e na mioglobina (veja Fig. 6-17). O heme C está covalentemente ligado à proteína do citocromo *c* através de ligações tioésteres de dois resíduos de Cys. O heme A, encontrado nos citocromos do tipo *a*, possui uma longa cauda isoprenóide ligada a um dos anéis de cinco átomos. O sistema de dupla ligação conjugada (sombreada em vermelho) do anel da porfirina é responsável pela absorção da luz visível por esses hemes.

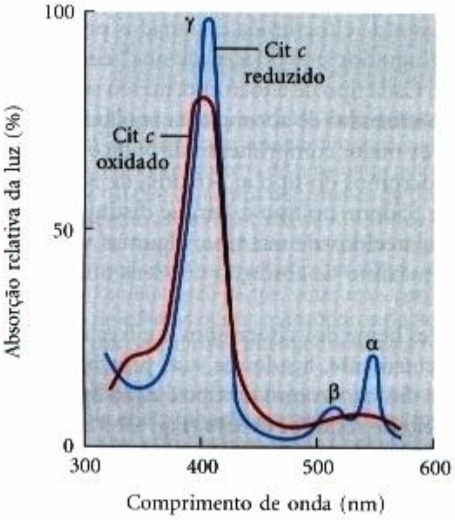
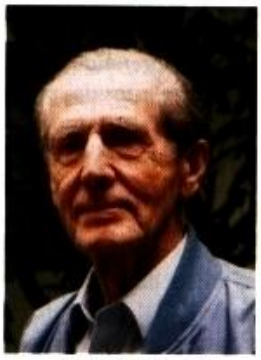


Figura 19-4 – Espectro de absorção do citocromo *c* nas suas formas oxidada (vermelho) e reduzida (azul). Também estão marcadas as bandas α, β e γ características da forma reduzida.

19-5). As **proteínas ferro-enxofre Rieske** (denominadas após sua descoberta) são uma variação nesse tema, em que um átomo de Fe está coordenado a dois resíduos de His em vez de dois resíduos de Cys. Todas as proteínas ferro-enxofre participam de transferências de um elétron em que cada átomo de ferro do arranjo ferro-enxofre está oxidado ou reduzido. Pelo menos, oito proteínas ferro-enxofre funcionam na transferência de elétrons da mitocôndria. O potencial de redução das proteínas ferro-enxofre varia de –0,65V a +0,45V, dependendo do microambiente do ferro na proteína.



Helmut Beinert

Na reação completa catalisada pela cadeia respiratória mitocondrial, os elétrons movem-se do NADH, succinato ou de algum outro doador primário de elétrons por meio das flavoproteínas, ubiquinona, proteínas ferro-enxofre, citocromo e, finalmente, para o O_2. A análise dos métodos usados para determinar a seqüência na qual esses carregadores atuam é instrutiva, uma vez que a mesma abordagem geral tem sido usada para estudar outras cadeias de transporte de elétrons, tais como as dos cloroplastos.

Primeiro, o potencial de redução padrão de cada um dos carregadores de elétrons foi determinado experimentalmente (Tabela 19-2). Espera-se que os carregadores funcionem em ordem crescente do potencial de redução, uma vez que os elétrons fluem espontaneamente dos carregadores de menor E'° para carregadores com E'° maiores. A ordem dos carregadores deduzida por esse método é: NADH → Q → citocromo *b* → citocromo c_1 → citocromo *c* → citocromo *a* → citocromo a_3 → O_2. Note, contudo, que a ordem dos potenciais de redução padrão não é necessariamente a mesma que a dos potenciais de redução ver-

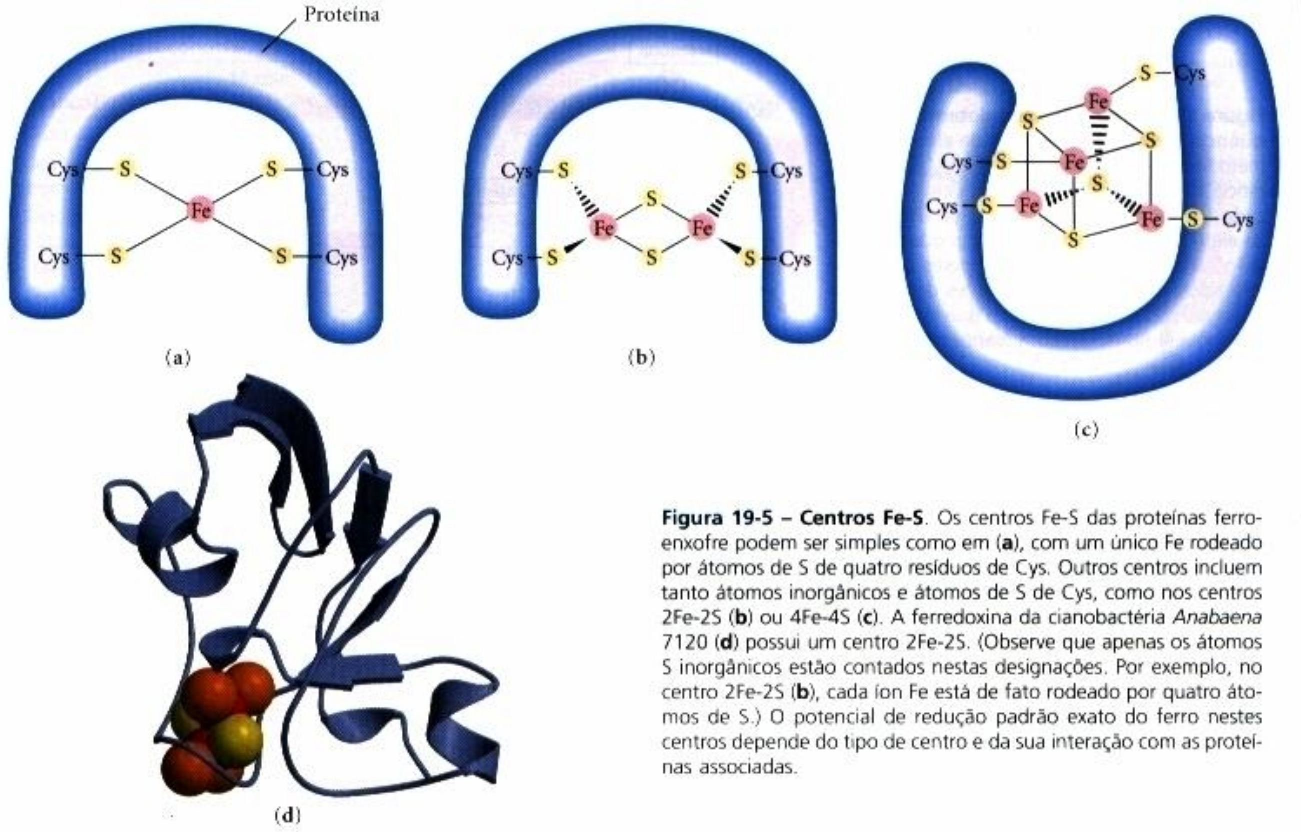


Figura 19-5 – Centros Fe-S. Os centros Fe-S das proteínas ferro-enxofre podem ser simples como em (**a**), com um único Fe rodeado por átomos de S de quatro resíduos de Cys. Outros centros incluem tanto átomos inorgânicos e átomos de S de Cys, como nos centros 2Fe-2S (**b**) ou 4Fe-4S (**c**). A ferredoxina da cianobactéria *Anabaena* 7120 (**d**) possui um centro 2Fe-2S. (Observe que apenas os átomos S inorgânicos estão contados nestas designações. Por exemplo, no centro 2Fe-2S (**b**), cada íon Fe está de fato rodeado por quatro átomos de S.) O potencial de redução padrão exato do ferro nestes centros depende do tipo de centro e da sua interação com as proteínas associadas.

Tabela 19-2 – Potenciais de redução padrão da cadeia respiratória e dos transportadores de elétrons relacionados

Reação redox (meia-reação)	E'° (V)
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$	–0,414
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH$	–0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADPH$	–0,324
NADH desidrogenase (FMN) + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADH desidrogenase ($FMNH_2$)	–0,30
Ubiquinona + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol	0,045
Citocromo *b* (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *b* (Fe^{2+})	0,077
Citocromo c_1 (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo c_1 (Fe^{2+})	0,22
Citocromo *c* (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *c* (Fe^{2+})	0,254
Citocromo *a* (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *a* (Fe^{2+})	0,29
Citocromo a_3 (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo a_3 (Fe^{2+})	0,55
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$	0,816

dadeiros em condições celulares, que dependem da concentração das formas reduzida e oxidada (pág. 401). Um segundo método para determinar a seqüência dos carregadores de elétrons envolve a redução experimental da cadeia completa de carregadores quando se fornece uma fonte de elétrons, mas nenhum aceptor de elétrons (sem O_2). Quando o O_2 é introduzido abruptamente no sistema, a velocidade com que cada transportador de elétrons se oxida (medida espectroscopicamente) mostra a ordem na qual os transportadores funcionam. O transportador mais próximo do O_2 (na extremidade da cadeia) libera seu elétron primeiro, o segundo transportador a partir da extremidade é o próximo a ser oxidado, e assim por diante. Tais experimentos confirmaram a seqüência deduzida a partir dos potenciais de redução padrão.

Para uma confirmação final, agentes que inibem o fluxo de elétrons através da cadeia têm sido usados combinados com medidas do grau de oxidação de cada transportador. Na presença de O_2 e um doador de elétrons, os transportadores que atuam antes da etapa inibida ficam totalmente reduzidos e aqueles que atuam depois do bloqueio ficam completamente oxidados (Fig. 19-6). Usando-se vários inibidores que bloqueiam a cadeia em diferentes locais, a seqüência completa foi deduzida e ela é a mesma prevista pelas duas abordagens anteriores.

Os transportadores de elétrons funcionam em complexos multienzimáticos

Os transportadores de elétrons da cadeia respiratória estão organizados em complexos supramoleculares embebidos na membrana que podem ser fisicamente separados. O tratamento brando da membrana mitocondrial interna com detergentes permite a resolução de quatro únicos complexos transportadores de elétrons, cada um capaz de catalisar a transferência de elétrons através de uma parte da cadeia (Fig. 19-7; Tabela 19-3). Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: o NADH (complexo I) e o succinato (complexo II). O complexo III transporta elétrons da ubiquinona até o citocromo *c*, e o complexo IV completa a seqüência transferindo elétrons do citocromo *c* para o O_2.

Figura 19-6 – Método para determinar a seqüência dos transportadores de elétrons. Este método mede os efeitos de inibidores da transferência de elétrons sobre o estado de oxidação de cada transportador. Na presença de um doador de elétrons e de O_2, cada inibidor produz um padrão característico de transportadores oxidados/reduzidos: aqueles que estão antes do bloqueio ficam reduzidos (azul) e aqueles que estão depois do bloqueio ficam oxidados (vermelho).

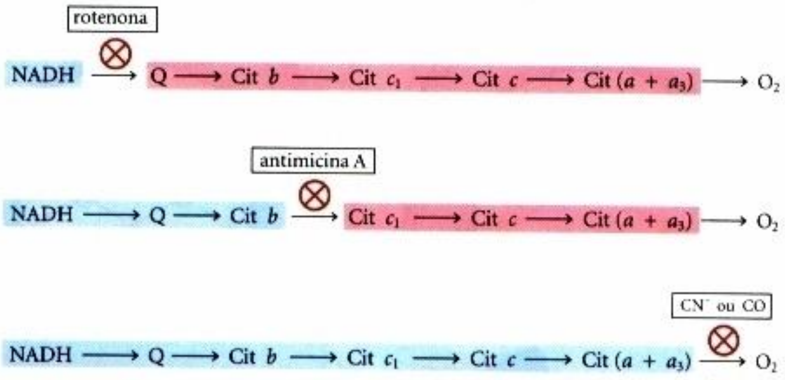

rotenona
NADH → Q → Cit b → Cit c₁ → Cit c → Cit (a + a₃) → O₂
antimicina A
NADH → Q → Cit b → Cit c₁ → Cit c → Cit (a + a₃) → O₂
CN⁻ ou CO
NADH → Q → Cit b → Cit c₁ → Cit c → Cit (a + a₃) → O₂

Figura 19-7 – Separação dos complexos funcionais da cadeia respiratória. A membrana mitocondrial externa é inicialmente removida através de tratamento com o detergente digitonina. Fragmentos da membrana interna são então obtidos por ruptura osmótica da mitocôndria e os fragmentos são cuidadosamente dissolvidos em um segundo detergente. A mistura resultante das proteínas da membrana interna é resolvida, por meio de cromatografia de troca iônica, nos diferentes complexos (I até IV) da cadeia respiratória, cada um com sua composição protéica única (veja Tabela 19-3) e a enzima ATP sintase (algumas vezes chamada de complexo V). Os complexos I a IV isolados catalisam as transferências entre doadores (NADH e succinato), transportadores intermediários (Q e citocromo c) e O_2, conforme mostrado. *In vitro*, a ATP sintase apresenta apenas a atividade de hidrólise do ATP (ATPase), mas não a de síntese do ATP.

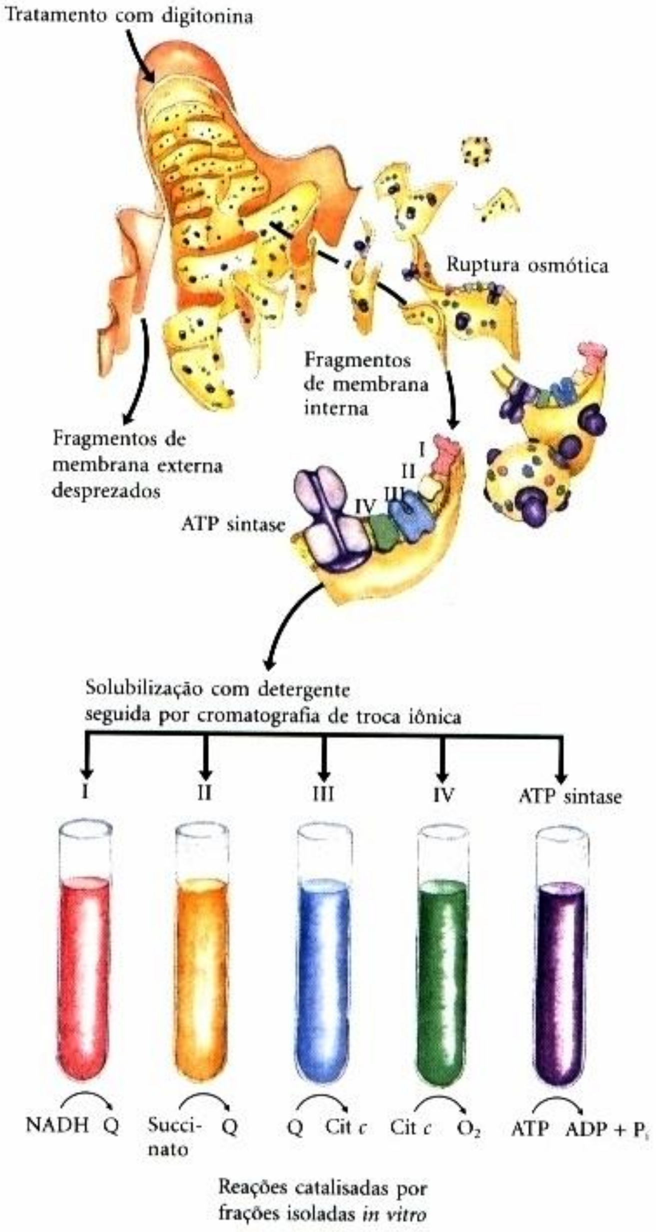

Tratamento com digitonina
Ruptura osmótica
Fragmentos de membrana interna
Fragmentos de membrana externa desprezados
I
II
III
IV
ATP sintase
Solubilização com detergente seguida por cromatografia de troca iônica
I
II
III
IV
ATP sintase
NADH Q
Succi-nato Q
Q Cit c
Cit c O₂
ATP ADP + Pᵢ
Reações catalisadas por frações isoladas in vitro

Tabela 19-3 – Componentes protéicos da cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria

Complexo enzimático	Massa (kDa)	Número de subunidades[*]	Grupo prostético
I NADH desidrogenase	850	42 (14)	FMN, Fe-S
II Succinato desidrogenase	140	5	FAD, Fe-S
III Ubiquinona: citocromo *c* oxidorredutase	250	11	Hemes, Fe-S
Citocromo *c*[†]	13	1	Heme
IV Citocromo oxidase	160	13 (3-4)	Hemes, Cu_A, Cu_B

[*] Número de subunidades em bactéria entre parênteses.

[†] Citocromo *c* não é parte de um complexo enzimático, mas se move livremente entre os complexos III e IV como uma proteína solúvel.

Vamos agora analisar com mais detalhes a estrutura e a função de cada complexo da cadeia respiratória mitocondrial.

Complexo I: NADH até ubiquinona. A Figura 19-8 ilustra a relação entre os complexos I, II e a ubiquinona. O **complexo I**, também chamado de **NADH:ubiquinona oxidorredutase**, é uma grande molécula de enzima composta por 42 cadeias polipeptídicas diferentes, incluindo uma flavoproteína ligada a FMN e, pelo menos, a seis centros Fe-S (Tabela 19-3). A microscopia eletrônica de alta resolução mostra que o complexo I tem a forma de L, com um braço do L na membrana e o outro prolongando-se em direção à matriz. Conforme mostrado na Figura 19-9, o complexo I catalisa simultânea e obrigatoriamente dois processos acoplados: (1) a transferência exergônica de um íon hidreto do NADH para a ubiquinona e um próton da matriz:

$$NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 \qquad (19\text{-}1)$$

e (2) a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranoso. Entretanto, o complexo I é uma bomba de próton movida pela energia da transferência de elétrons e a reação que ela catalisa é **vetorial**: ela movimenta os prótons em uma direção específica de um local (a matriz, que se torna negativamente carregada com a saída de prótons) para outro (o espaço intermembranoso, que se torna positivamente carregado). Para enfatizar a natureza vetorial do processo, a reação global geralmente é escrita com subscritos que indicam a localização dos prótons: P para o lado positivo da membrana interna (o espaço intermembranoso), N para o lado negativo (a matriz):

$$NADH + 5H_N^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H_P^+ \qquad (19\text{-}2)$$

O amital (uma droga barbitúrica), a rotenona (um produto vegetal comumente usado como inseticida) e a piericidina A (um antibiótico) inibem o fluxo de elétrons dos centros Fe-S do complexo I para a ubiquinona (Tabela 19-4) e, por isso, bloqueia todo o processo de fosforilação oxidativa.

O ubiquinol (QH_2, a forma completamente reduzida; Fig. 19-2) difunde-se na membrana interna, do complexo I até o complexo III, onde é oxidado a Q em um processo que envolve o movimento de prótons para o lado externo (da matriz para o citosol).

Complexo II: succinato até ubiquinona. No Capítulo 16, encontramos o **complexo II** com o nome de **succinato desidrogenase**; a única enzima do ciclo de Krebs que é ligada à membrana (págs. 449-450). Embora menor e mais simples que o complexo I, ele contém dois tipos de grupos prostéticos e, pelo menos, quatro proteínas diferentes (Tabela 19-3). Uma proteína possui um FAD ligado covalentemente e um centro Fe-S com quatro átomos de

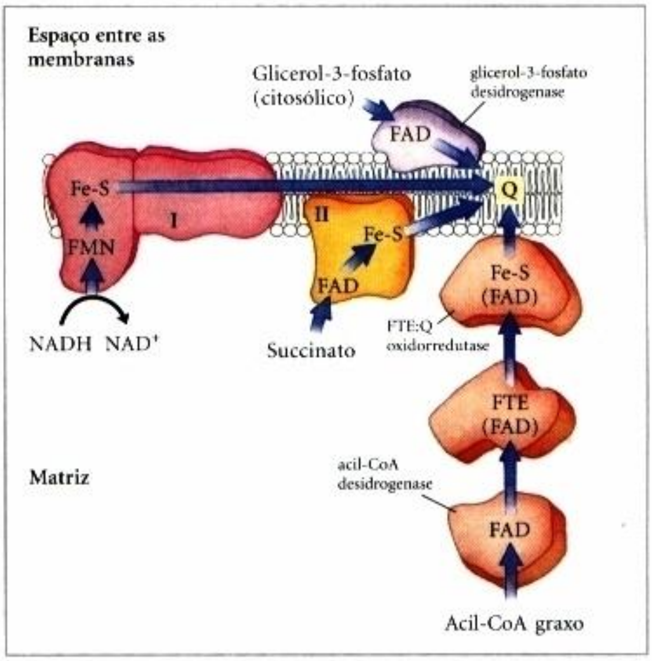


Figura 19-8 – Via dos elétrons do NADH, succinato, acil-CoA graxo e glicerol-3-fosfato até a ubiquinona. Elétrons do NADH passam por uma flavoproteína e uma série de proteínas ferro-enxofre (no complexo I) e depois vão para Q. Os elétrons do succinato passam por uma flavoproteína e vários centros Fe-S (no complexo II) em seu caminho para Q. O glicerol-3-fosfato doa elétrons para uma flavoproteína (glicerol-3-fosfato desidrogenase) na superfície externa da membrana mitocondrial interna, da qual eles passam para Q. A acil-CoA desidrogenase (a primeira enzima na β-oxidação) transfere os elétrons para a flavoproteína transferidora de elétrons (FTE). A partir daí, os elétrons passam para Q via FTE-ubiquinona oxidorredutase.

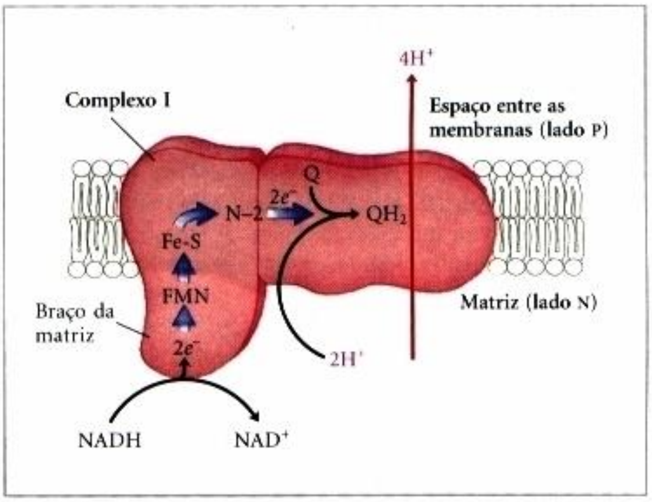


Figura 19-9 – NADH:ubiquinona oxidorredutase (complexo I). O complexo I catalisa a transferência de um íon hidreto do NADH para o FMN, do qual dois elétrons passam através de uma série de centros Fe-S para a proteína ferro-enxofre N-2 no braço da matriz do complexo. A transferência de elétrons da N-2 para a ubiquinona no braço da membrana forma QH_2, que difunde para a bicamada lipídica. Ela também dirige a expulsão de quatro prótons por par de elétrons, da matriz. O mecanismo detalhado que acopla a transferência de elétrons e prótons no complexo I ainda não é conhecido, mas, provavelmente, envolve um ciclo Q similar àquele no complexo III em que QH_2 participa duas vezes por par de elétron (veja Fig. 19-11). Esse fluxo de prótons produz um potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna (lado N negativo, lado P positivo), que conserva alguma energia liberada pelas reações de transferência de prótons. Esse potencial eletroquímico dirige a síntese de ATP.

Tabela 19-4 – Alguns agentes que interferem com a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação

Tipo de interferência	Composto*	Alvo/modo de ação
Inibição da transferência de elétrons	Cianeto	Inibe a citocromo oxidase
	Monóxido de carbono	
	Antimicina A	Bloqueia a transferência de elétrons do citocromo *b* para o citocromo c_1
	Mixotiazol	Impede a transferência de elétrons do centro Fe-S para a ubiquinona
	Rotenona	
	Amital	
	Piericidina A	
	DCMU	Compete com Q_B pelo sítio de ligação em PSII
Inibição da ATP sintase	Aurovertina	Inibe F_1
	Oligomicina	Inibe F_o e CF_o
	Venturicidina	
	DCCD	Bloqueia o fluxo de prótons através de F_o e CF_o
Desacoplamento da fosforilação da transferência de elétrons	FCCP	Carregadores hidrofóbicos de prótons
	DNP	
	Valinomicina	Ionóforo para K^+
	Termogenina	Forma poros condutores de prótons na membrana interna das mitocôndrias de tecido marrom gorduroso
Inibição da troca ATP-ADP	Atractilosídeo	Inibe a adenina nucleotídeo translocase

*DCMU é o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia; DCCD, diciclohexilcarbodiimida; FCCP, carbonilcianeto de *p*-trifluormetoxifenilhidrazona; DNP, 2,4-dinitrofenol.

Fe; uma segunda proteína ferro-enxofre também está presente (veja frontispício). Os elétrons passam do succinato para o FAD e, então, através dos centros Fe-S, para a ubiquinona (Fig. 19-8).

Outros substratos para as desidrogenases mitocondriais também passam elétrons para a cadeia respiratória no nível da ubiquinona, mas não por meio do complexo II. A primeira etapa na β-oxidação dos acil-CoA graxos, catalisada pela flavoproteína **acil-CoA desidrogenase** (pág. 470), envolve a transferência de elétrons do substrato para o FAD da desidrogenase, depois para uma flavoproteína transferidora de elétrons (FTE) que, por sua vez, passa seus elétrons para a **FTE:ubiquinona oxidorredutase** (Fig. 19-8). Essa enzima passa os elétrons para a cadeia respiratória, reduzindo a ubiquinona. O glicerol-3-fosfato, formado por meio da liberação do glicerol devido à degradação dos triacilgliceróis ou por meio da redução da diidroxiacetona formada na via glicolítica, é oxidado pela **glicerol-3-fosfato desidrogenase** (veja Fig. 17-4). Essa enzima é uma flavoproteína, localizada na superfície externa da membrana mitocondrial interna e, tal como a succinato desidrogenase e a acil-CoA desidrogenase, ela canaliza elétrons para a cadeia respiratória, reduzindo a ubiquinona (Fig. 19-8). O importante papel da glicerol-3-fosfato desidrogenase em transportar equivalentes redutores do NADH citosólico para a matriz mitocondrial será descrito posteriormente (veja Fig. 19-27). O efeito de cada uma dessas enzimas transferidoras de elétrons é contribuir para o reservatório de ubiquinona reduzida. A QH_2 de todas essas reações é reoxidada pelo complexo III, o componente seguinte da cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria.

Complexo III: ubiquinona até citocromo *c*. O complexo III, o próximo complexo respiratório e também chamado de **complexo dos citocromos bc_1** ou **ubiquinona-citocromo *c* oxidorredutase**, acopla a transferência de elétrons do ubiquinol (QH_2) para o citocromo *c* com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembranoso. A determinação das estruturas desse enorme complexo (Fig. 19-10) e do complexo IV (a seguir), por meio de cristalografia de raios X, em 1995-1998, foram marcos no estudo da transferência de elétrons mitocondriais, propiciando a armação estrutural para integrar as inúmeras observações bioquímicas sobre a função dos complexos.

Baseado na estrutura do complexo III e nos estudos bioquímicos detalhados das reações redox, foi proposto um modelo razoável para a passagem dos elétrons e prótons por meio desse complexo. A equação global para as reações redox desse **ciclo Q** (Fig. 19-11) é:

$$QH_2 + 2\text{ cit } c_{1(\text{oxidado})} + 2H^+_N \longrightarrow Q + 2\text{ cit } c_{1(\text{reduzido})} + 4H^+_P \quad (19\text{-}3)$$

O ciclo Q acomoda o comutador entre o carregador de elétrons (ubiquinona) e os carregadores de um elétron (citocromos b_{562}, b_{566}, c_1 e c) e explica a estequiometria de quatro prótons translocados por par de elétrons que passa por meio do complexo, para o citocromo *c*. Embora o caminho dos elétrons através desse segmento da cadeia respiratória seja complicado, o efeito global da transferência é simples: QH_2 é oxidado a Q e duas moléculas de citocromo *c* são reduzidas.

O citocromo *c* (veja Fig. 6-18) é uma proteína solúvel do espaço intermembranoso. Após o seu único heme aceitar um elétron do complexo III, o citocromo *c* se move em direção ao complexo IV para doar o elétron para um centro de cobre binuclear nessa enzima.

Complexo IV: citocromo *c* até O_2. No passo final da cadeia respiratória, o complexo IV, também chamado **citocromo oxidase**, transporta dois elétrons do citocromo *c* para o oxigênio molecular, reduzindo-o a H_2O. O complexo IV é uma proteína grande (13 subunidades; M_r 204.000) da membrana mitocondrial interna. As bactérias apresentam uma forma mais simples, com somente três ou quatro subunidades, mas ainda capaz de catalisar tanto a transferência de elétrons como o bombeamento de prótons. A comparação dos complexos da mitocôndria e da bactéria sugere que três subunidades são críticas para a função (Fig. 19-12).

A subunidade II mitocondrial contém dois íons cobre complexados aos grupos —SH de dois resíduos de Cys em um centro binuclear (denominado Cu_A) (Fig. 19-12b) que lembram as proteínas de centros 2Fe-2S. A subunidade I contém dois grupos heme designados *a* e a_3 e um outro íon cobre (Cu_B). O heme a_3 e o Cu_B formam um segundo centro binuclear que aceita elétrons do heme *a* e então os transfere para o O_2 ligado ao heme a_3.

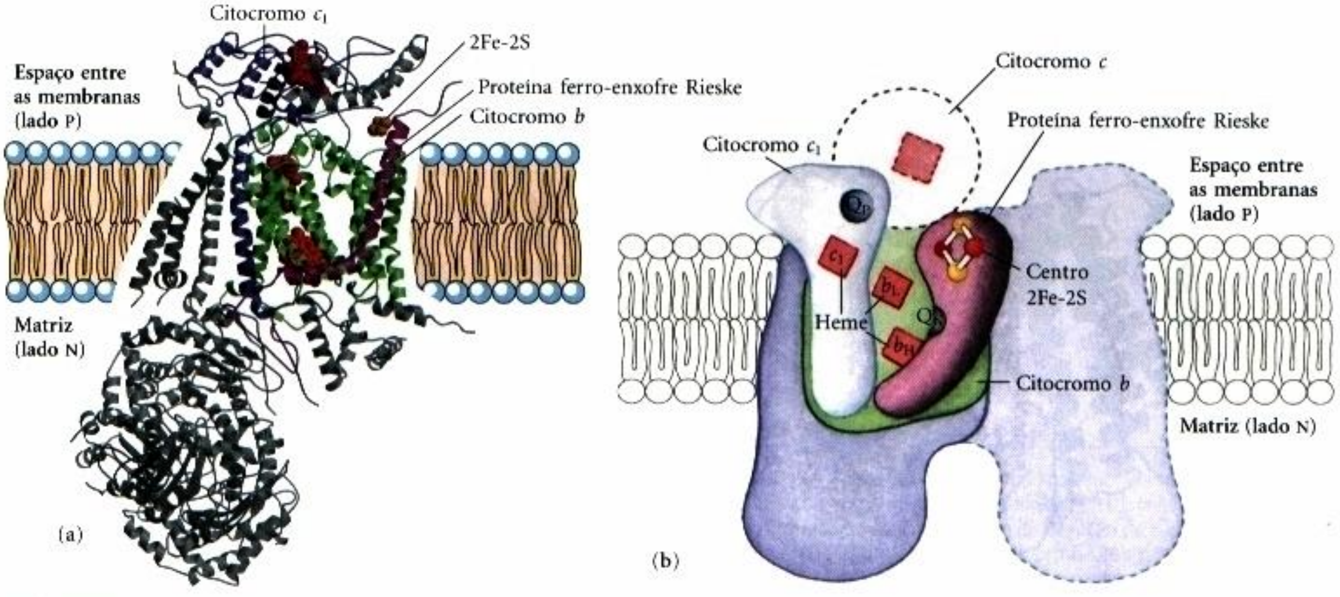
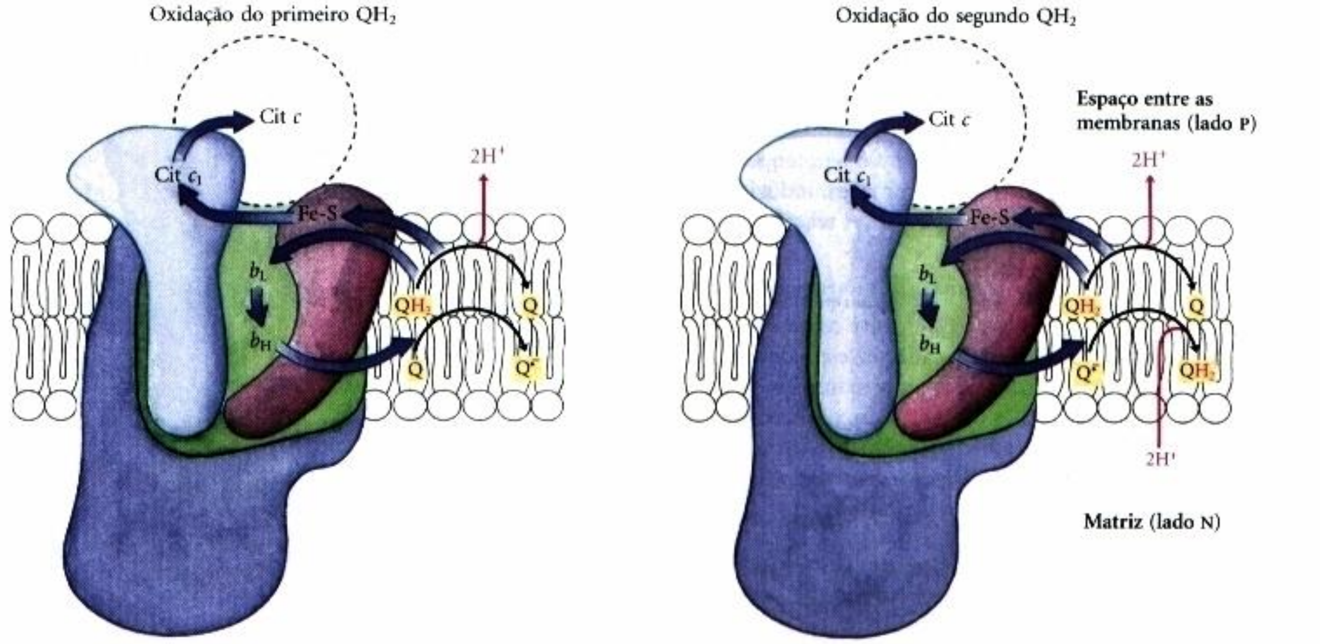

Citocromo c_1
2Fe-2S
Espaço entre as membranas (lado P)
Proteína ferro-enxofre Rieske
Citocromo b
Matriz (lado N)
(a)
Citocromo c
Proteína ferro-enxofre Rieske
Citocromo c_1
Espaço entre as membranas (lado P)
Q_P
c_1
b_L
Heme
Q_N
b_H
Centro 2Fe-2S
Citocromo b
Matriz (lado N)
(b)

Figura 19-10 – Complexo do citocromo *bc*$_1$ (complexo III). O complexo é um dímero de monômeros idênticos, cada um deles com 11 subunidades diferentes. (**a**) Estrutura do monômero. O centro funcional é formado por três subunidades: o citocromo *b* (verde) com seus dois hemes (b_H e b_L; vermelho claro), a proteína ferro-enxofre Rieske (púrpura) com seu centro 2Fe-2S (amarelo) e o citocromo c_1 (azul) com seu heme (vermelho). (**b**) A unidade funcional dimérica. O citocromo c_1 e a proteína ferro-enxofre Rieske se projetam a partir da superfície P e podem interagir com o citocromo c (mostrado aqui, mas não como parte do complexo funcional) no espaço intermembranoso. O complexo apresenta dois sítios de ligação distintos para a ubiquinona, Q_N e Q_P, que correspondem aos sítios de inibição por duas drogas que bloqueiam a fosforilação oxidativa. A antimicina A, que bloqueia o fluxo de elétrons do heme b_H para Q, liga-se a Q_N, próximo ao heme b_H no lado N (matriz) da membrana. O mixotiazol, que impede o fluxo de elétrons de QH_2 para a proteína ferro-enxofre Rieske, liga-se a Q_P, próximo ao centro 2Fe-2S e ao heme b_L no lado P da membrana. A estrutura dimérica é essencial para o funcionamento do complexo III. A interface entre os monômeros forma duas cavidades, cada uma contendo um sítio Q_P de um monômero e um sítio Q_N do outro. O movimento dos intermediários da ubiquinona ocorre dentro dessas cavidades protegidas.

O complexo III se cristaliza em duas conformações distintas (não mostradas). Em uma delas, o centro ferro-enxofre Rieske está próximo do seu aceptor de elétrons, o heme do citocromo c_1, mas relativamente distante do citocromo *b* e do sítio de ligação QH_2, por meio do qual ele recebe os elétrons. Na outra configuração, o centro Fe-S se afastou do citocromo c_1 em direção ao citocromo *b*. Acredita-se que a proteína Rieske oscile entre essas duas conformações, em que ela é primeiramente reduzida e depois oxidada.


Oxidação do primeiro QH_2
Cit c
Cit c_1
$2H^+$
Fe-S
b_L
b_H
QH_2
Q
Q
$Q^{\cdot}$
Oxidação do segundo QH_2
Cit c
Espaço entre as membranas (lado P)
Cit c_1
$2H^+$
Fe-S
b_L
b_H
QH_2
Q
$Q^{\cdot}$
QH_2
$2H^+$
Matriz (lado N)

$$QH_2 + \text{Cit } c_1 \text{ (oxidado)} \longrightarrow Q^{\cdot} + 2H^+_P + \text{Cit } c_1 \text{ (reduzido)}$$

$$QH_2 + Q^{\cdot} + 2H^+_N + \text{Cit } c_1 \text{ (oxidado)} \longrightarrow QH_2 + 2H^+_P + Q + \text{Cit } c_1 \text{ (reduzido)}$$

Equação global:

$$QH_2 + 2\text{ Cit } c_1 \text{ (oxidado)} + 2H^+_N \longrightarrow Q + 2\text{ Cit } c_1 \text{ (reduzido)} + 4H^+_P$$

Figura 19-11 – O ciclo Q. O caminho dos elétrons através do complexo III é mostrado pelas setas azuis. No lado P da membrana, duas moléculas de QH_2 são oxidadas até Q no sítio Q_P, liberando quatro prótons no espaço intermembranoso. Cada QH_2 doa um elétron (via centro Fe-S Rieske) ao citocromo c_1 e um elétron (via citocromo *b*) para a molécula de Q no sítio Q_N, reduzindo-o em duas etapas a QH_2. Essa redução também utiliza dois prótons captados da matriz.

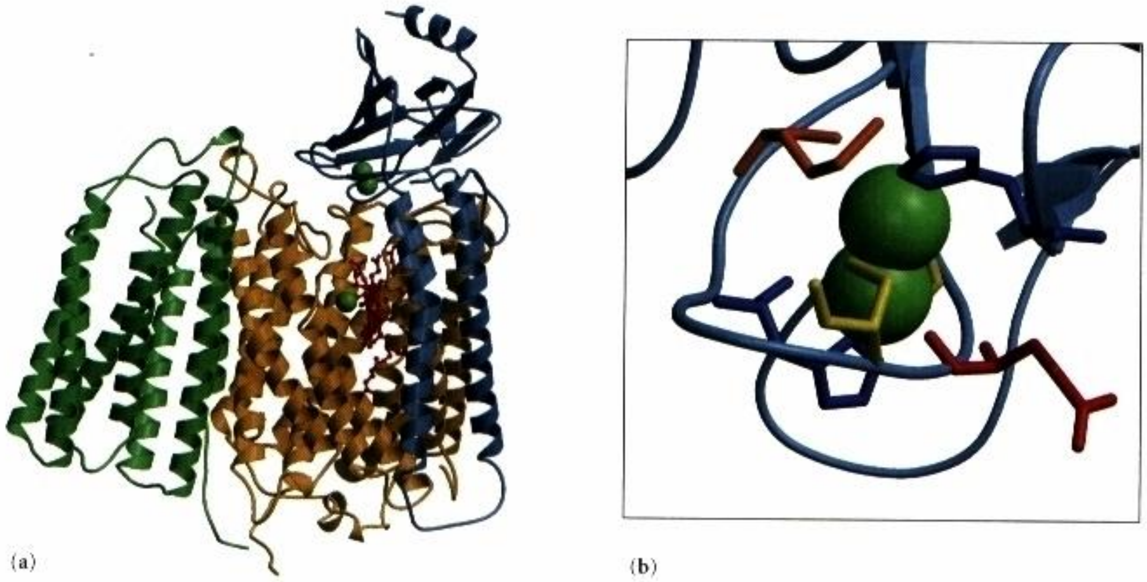


Figura 19-12 – Subunidades críticas da citocromo oxidase (complexo IV). É mostrado o complexo bovino. (**a**) O centro do complexo IV apresenta três subunidades. A subunidade I (amarela) tem dois grupos heme, a e a_3 (vermelho) e um ion cobre, Cu_B (esfera verde). O heme a_3 e o Cu_B formam um centro Fe-Cu binuclear. A subunidade II (azul) contém dois íons Cu (esferas verdes) complexadas com os grupos —SH de dois resíduos de Cys em um centro binuclear, Cu_A, que se assemelha aos centros 2Fe-2S das proteínas ferro-enxofre. Esse centro binuclear e o sítio de ligação do citocromo c estão localizados em um domínio da subunidade II, que se projeta do lado P da membrana interna para o espaço intermembranoso. A subunidade III (verde claro) aparentemente é essencial para o funcionamento do complexo IV, mas o seu papel não é bem conhecido. (**b**) O centro binuclear do Cu_A. Os íons Cu (esferas verdes) compartilham igualmente os elétrons. Quando o centro é reduzido, eles apresentam cargas formais $Cu^{1+}Cu^{1+}$, e quando oxidados, $Cu^{1,5+}Cu^{1,5+}$. Os ligantes, ao redor dos íons Cu, incluem duas His (azul-escuro), duas Cys (amarelo), um Asp (vermelho) e uma Met (alaranjado).

A transferência de elétrons por meio do complexo IV ocorre do citocromo *c* para o centro Cu_A, do heme *a* para o heme a_3-centro Cu_B e, finalmente, para o O_2 (Fig. 19-13). Para cada quatro elétrons que passam através desse complexo, a enzima consome quatro "substratos" H^+ da matriz (lado N) convertendo o O_2 em 2 H_2O. Ela também usa a energia dessa reação redox para bombear um próton para o espaço intermembranoso (lado P) para cada elétron transportado, aumentando o potencial eletroquímico produzido pelo transporte de prótons, induzido pelas reações redox, através dos complexos I e III. A reação global catalisada pelo complexo IV é:

$$4\text{ cit } c_{(\text{reduzido})} + 8H^+_N + O_2 \longrightarrow 4\text{ cit } c_{(\text{oxidado})} + 4H^+_P + 2H_2O \quad (19\text{-}4)$$

Esta redução de quatro elétrons do O_2 envolve centros redox que transportam apenas um elétron de cada vez e ela deve ocorrer sem gerar intermediários incompletamente reduzidos, tais como o peróxido de hidrogênio ou os radicais hidroxila livres, que são espécies muito reativas que podem danificar os componentes celulares. Os intermediários permanecem firmemente ligados ao complexo até serem completamente convertidos em água.

A energia da transferência dos elétrons é conservada eficientemente em um gradiente de prótons

A transferência de dois elétrons do NADH, por meio da cadeia respiratória, para o oxigênio molecular pode ser escrita como:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O \quad (19\text{-}5)$$

Esta reação global é altamente exergônica. Para o par redox $NAD^+/NADH$, E'° é –0,320V e, para o par O_2/H_2O, E'° é 0,816V. Portanto, o $\Delta E'^{\circ}$ para esta reação é +1,14V e a variação de energia livre padrão (Eq. 14-6, pág. 401) é:

$$\begin{aligned} \Delta G'^{\circ} &= -n\mathcal{F}\Delta E'^{\circ} \\ &= -2(96{,}5\text{kJ/V}\cdot\text{mol})(1{,}14\text{V}) \quad (19\text{-}6) \\ &= -220\text{kJ/mol (de NADH)} \end{aligned}$$

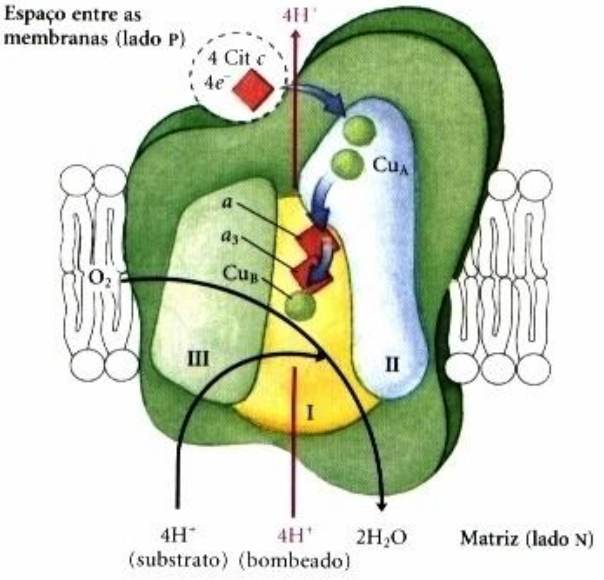


Figura 19-13 – O caminho dos elétrons por meio do complexo IV. As três proteínas críticas para o fluxo dos elétrons são I, II e III. O contorno mais claro inclui as outras dez proteínas do complexo. A transferência de elétrons por meio do complexo IV começa quando cada uma das duas moléculas de citocromo c reduzido doa um elétron para o centro binuclear Cu_A. Os elétrons então passam, por meio do heme *a*, para o centro Fe-Cu (citocromo a_3 e Cu_B). O oxigênio então se liga ao heme a_3 e é reduzido até seu derivado peróxido (O_2^{2-}) por dois elétrons do centro Fe-Cu. A liberação de mais dois elétrons do citocromo c converte o O_2^{2-} em duas moléculas de água, consumindo quatro "substratos" prótons da matriz. Simultaneamente, quatro outros prótons são bombeados da matriz por meio de um mecanismo ainda desconhecido.

Essa mudança de energia livre *padrão* é baseada na consideração de que as concentrações de NADH e NAD^+ são iguais (1M). Na mitocôndria que respira ativamente, a ação de várias desidrogenases mantém a relação $NADH/NAD^+$ acima da unidade e a verdadeira mudança de energia livre para a reação mostrada na Equação 19-5 é, de fato, substancialmente maior (mais negativa) que −220kJ/mol. Um cálculo semelhante para a oxidação do succinato mostra que a transferência de elétrons do succinato (E'° do fumarato/succinato = 0,031V) para o O_2 tem uma variação de energia livre padrão menor, mas ainda negativa, da ordem de −150kJ/mol.

A maior parte dessa energia é usada para bombear os prótons para fora da matriz. Para cada par de elétrons transferidos para o O_2, quatro prótons são bombeados para fora pelo complexo I, quatro pelo complexo III, e dois pelo complexo IV (Fig. 19-14). Portanto, a equação *vetorial* para o processo é:

$$\mathrm{NADH} + 11\mathrm{H}^+_\mathrm{N} + \tfrac{1}{2}\mathrm{O}_2 \longrightarrow \mathrm{NAD}^+ + 10\mathrm{H}^+_\mathrm{P} + \mathrm{H}_2\mathrm{O} \qquad (19\text{-}7)$$

A energia eletroquímica inerente a essa diferença na concentração de prótons e separação de cargas representa uma conservação temporária da maior parte da energia da transferência dos elétrons. A energia armazenada nesse gradiente, denominada **força próton motriz**, apresenta dois componentes: (1) a energia potencial química devido à diferença na concentração de uma espécie química (H^+) em duas regiões separadas pela membrana e (2) a energia potencial elétrica que resulta da separação de carga quando um próton se move através da membrana sem um contra-íon (Fig. 19-15).

Conforme mostrado no Capítulo 12, a mudança de energia livre para a criação de um gradiente eletroquímico por uma bomba de íons é:

$$\Delta G = -RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\Delta\psi \qquad (19\text{-}8)$$

onde C_2/C_1 é a razão entre as concentrações para o íon que se desloca; Z é o valor absoluto da sua carga (1 para o próton) e $\Delta\psi$ é a diferença de potencial elétrico transmembrana, dada em volts.

Para prótons a 25°C,

$$\ln (C_2/C_1) = 2{,}3(\log\,[H^+]_P - \log\,[H^+]_N) = 2{,}3(pH_N - pH_P) = 2{,}3\ \Delta pH$$

e a Equação 19-8 se reduz a:

$$\begin{aligned}\Delta G &= 2{,}3RT\,\Delta pH + \mathcal{F}\Delta\psi \qquad (19\text{-}9)\\ &= (5{,}70\text{kJ/mol})\Delta pH + (96{,}5\text{kJ} \cdot \text{mol})\Delta\psi\end{aligned}$$

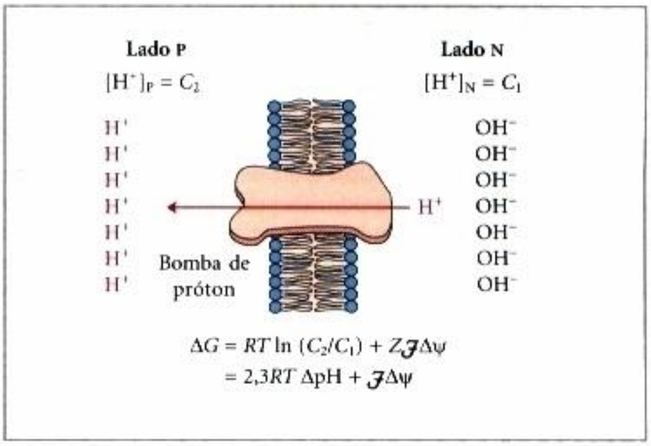

Lado P
$[H^+]_P = C_2$
Lado N
$[H^+]_N = C_1$
H^+
OH^-
Bomba de próton
$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\Delta\psi$
$= 2{,}3RT\,\Delta pH + \mathcal{F}\Delta\psi$

Figure 19-15 – Força próton motriz. A membrana interna da mitocôndria separa dois compartimentos de diferente $[H^+]$, resultando em diferenças na concentração química (ΔpH) e distribuição de carga ($\Delta\psi$) através da membrana. O efeito global é a força próton motriz (ΔG) que pode ser calculada como mostrado. Isso é explicado com mais detalhes no texto.

Em uma mitocôndria que respira ativamente, o $\Delta\psi$ medido é 0,15-0,2V e o pH da matriz é cerca de 0,75 unidade mais alcalino que o do espaço intermembranoso, de tal modo que a mudança de energia livre calculada para bombear prótons para fora é da ordem de +20kJ/mol (de H^+), a maior parte da qual é proveniente da porção elétrica do potencial eletroquímico. Uma vez que a transferência de dois elétrons do NADH para o O_2 é acompanhada pelo bombeamento para fora de 10 H^+ (Eq. 19-7), aproximadamente 200kJ dos 220kJ liberados pela oxidação de um mol de NADH são conservados no gradiente de prótons.

Quando os prótons se deslocam espontaneamente a favor do seu gradiente eletroquímico, a energia é disponibilizada para produzir trabalho. Nas mitocôndrias, cloroplastos e bactérias aeróbicas, a energia eletroquímica no gradiente de prótons direciona a síntese de ATP a partir de ADP e P_i. Nós voltaremos à energética e à estequiometria da síntese de ATP direcionada pelo potencial eletroquímico no gradiente de prótons posteriormente neste capítulo.

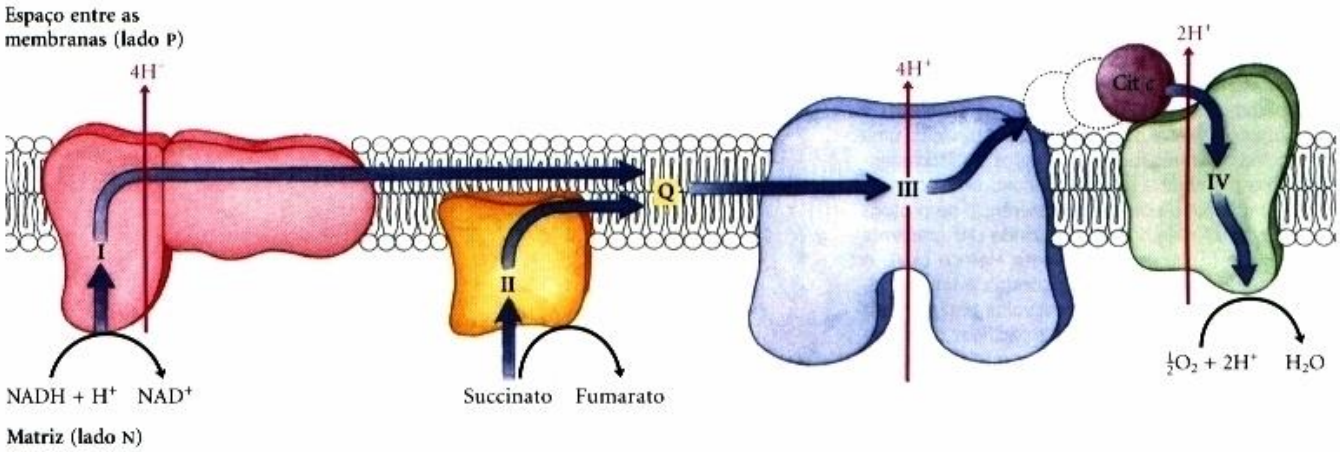


Figura 19-14 – Resumo do fluxo de elétrons e prótons por meio dos quatro complexos da cadeia respiratória. Os elétrons alcançam Q por meio dos complexos I e II. QH_2 funciona como um transportador móvel de elétrons e prótons. Ela transfere elétrons para o complexo III, que os transfere para uma outra conexão móvel, o citocromo c. O complexo IV transfere então os elétrons do citocromo c reduzido para o O_2. O fluxo de elétrons por meio dos complexos I, III e IV é acompanhado por um fluxo de prótons da matriz para o espaço intermembranoso. Lembrar que os elétrons da β-oxidação dos ácidos graxos também podem entrar na cadeia respiratória por meio de Q (veja Fig. 19-8).

As mitocôndrias das plantas possuem mecanismos alternativos para oxidar o NADH

As mitocôndrias das plantas fornecem ATP durante os períodos de baixa iluminação ou escuridão por meio de mecanismos inteiramente análogos àqueles usados pelos organismos não-fotossintéticos. Na luz, a principal fonte de NADH mitocondrial é a reação na qual a glicina produzida pela fotorrespiração é convertida em serina (veja Fig. 20-39):

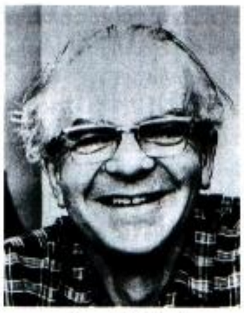
$$2\ \text{Glicina} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{serina} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2 + \text{NH}_4^+$$

Por razões discutidas no Capítulo 20, as plantas devem efetuar esta reação, mesmo quando não têm necessidade de usar NADH para produzir ATP. Para regenerar o NAD^+, a partir de NADH desnecessário, a mitocôndria das plantas transfere elétrons do NADH diretamente para a ubiquinona, e da ubiquinona diretamente para o O_2, desviando-os dos complexos III e IV e de suas bombas de prótons. A energia em NADH é dissipada na forma de calor, que, algumas vezes, pode ser de valor para a planta (Adendo 19-1). Contrariamente à citocromo oxidase (complexo IV), a QH_2 oxidase alternativa não é inibida por cianeto. A oxidação do NADH resistente ao cianeto é, de fato, uma marca característica dessa via de transporte de elétrons em plantas.

A Síntese de ATP

Como o gradiente de concentração de prótons é transformado em ATP? Vimos que a transferência de elétrons libera e a força próton motriz conserva energia livre mais que suficiente (cerca de 200kJ) por "mol" de pares de elétrons para formar um mol de ATP que requer 50kJ (veja Adendo 14-2). Portanto, a fosforilação oxidativa mitocondrial não representa nenhum problema termodinâmico. Vamos agora considerar o mecanismo químico que acopla o fluxo de elétrons com a fosforilação.

O **modelo quimiosmótico** proposto por Peter Mitchell é o paradigma para esse mecanismo. De acordo com o modelo (Fig. 19-16), a energia eletroquímica inerente da diferença na concentração de prótons e da separação de cargas através da membrana mitocondrial interna, a força próton motriz, dirige a síntese de ATP à medida que os prótons fluem passivamente de volta para a matriz através de um poro de prótons associado à **ATP sintase**. Para enfatizar esse papel crucial da força próton motriz, a equação da síntese do ATP é dada por:



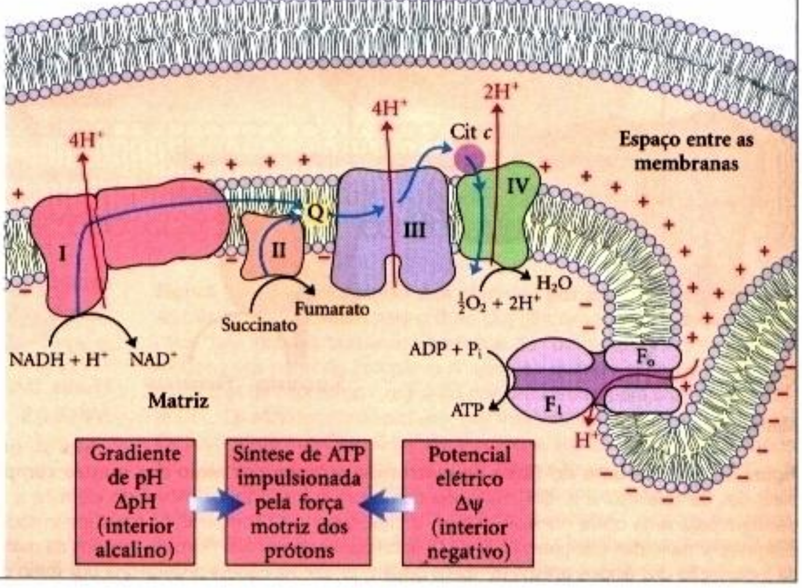
Peter Mitchell
(1920-1992)

$$\text{ADP} + \text{P}_i + n\text{H}^+_P \longrightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + n\text{H}^+_N \qquad (19\text{-}10)$$

A definição operacional de "acoplamento" é mostrada na Figura 19-17. Quando mitocôndrias isoladas são suspensas em uma solução-tampão contendo ADP, P_i e um substrato oxidável, como o succinato, ocorrem três processos facilmente mensuráveis: (1) o substrato é oxidado (succinato produz fumarato), (2) o O_2 é consumido, e (3) o ATP é sintetizado. O consumo de oxigênio e a síntese de ATP dependem da presença de um substrato oxidável (nesse caso, o succinato) bem como de ADP e P_i.

Como a energia da oxidação do substrato dirige a síntese do ATP na mitocôndria, não é inesperado que inibidores do transporte de elétrons para o O_2 (por exemplo, cianeto, monóxido de carbono, antimicina A) bloqueiem a síntese de ATP (Fig. 19-17a). Mais surpreendente é o achado de que o inverso também é verdadeiro: inibição da síntese de ATP bloqueia a transferência de elétrons na mitocôndria intacta. Esse acoplamento obrigatório pode ser demonstrado em mitocôndrias isoladas suprindo-as de O_2 e substratos oxidáveis, mas não de ADP (Fig. 19-17b). Nessas condições, não ocorre nenhuma síntese de ATP e a transferência de elétrons para o O_2 não acontece. O acoplamento da oxidação e fosforilação também pode ser demonstrado usando-se oligomicina ou venturicidina, antibióticos tóxicos, que se li-

Figura 19-16 – O modelo quimiosmótico. Nesta representação simples da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria, os elétrons do NADH e outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de carregadores arranjados simetricamente na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado por uma transferência de prótons através da membrana produzindo um gradiente químico (ΔpH) e um gradiente elétrico (Δψ). A membrana interna da mitocôndria é impermeável aos prótons e eles podem voltar para a matriz somente através de canais específicos para prótons (F_o). A força próton motriz que direciona os prótons de volta para a matriz propicia a energia para a síntese de ATP que é catalisada pelo complexo F_1 associado a F_o.


4H⁺
4H⁺
2H⁺
Cit c
Espaço entre as membranas
I
II
Q
III
IV
H₂O
½O₂ + 2H⁺
Fumarato
Succinato
NADH + H⁺
NAD⁺
ADP + Pᵢ
Fₒ
F₁
ATP
H⁺
Matriz
Gradiente de pH ΔpH (interior alcalino)
Síntese de ATP impulsionada pela força motriz dos prótons
Potencial elétrico Δψ (interior negativo)

Adendo 19-1 Vias respiratórias alternativas e calor, plantas malcheirosas

Muitas plantas floridas atraem insetos polinizadores, liberando moléculas odoríferas que mimetizam uma fonte de alimento natural de insetos ou locais potenciais de postura de ovos. As plantas polinizadas por moscas ou escaravelhos, que normalmente ali se alimentam ou põem seus ovos em esterco ou carne podre, algumas vezes usam compostos com mau cheiro para atrair esses insetos.

Uma família de plantas malcheirosas é a Araceae, que inclui os filodendros, os copos-de-lírio e de uma espécie de couve malcheirosa. Essas plantas apresentam folhas delgadas densamente empacotadas em uma estrutura ereta chamada espádice, rodeada por uma folha modificada chamada espata. A espádice libera odores de carne putrefata ou esterco. Antes da polinização, a espádice também se aquece, em muitas espécies de 20 a 40°C acima da temperatura ambiente. A produção de calor (termogênese) ajuda a evaporação das moléculas odoríferas para uma melhor dispersão. Como a carne putrefata e o esterco são geralmente quentes devido ao metabolismo hiperativo dos micróbios carniceiros, o próprio calor também pode atrair insetos. No caso da couve malcheirosa (Fig. 1), que floresce no final do inverno ou no começo da primavera quando a neve ainda cobre o solo, a termogênese permite que a espádice cresça através da neve.

Figura 1 – Espécie de couve oriental malcheirosa.

Como essa espécie de couve aquece sua espádice? Embora as mitocôndrias das plantas, fungos e eucariotos unicelulares apresentem sistemas de transporte de elétrons que são essencialmente os mesmos que os dos animais, elas apresentam uma via respiratória alternativa. Nessa via, a QH_2, que é resistente ao cianeto, transfere os elétrons do reservatório de ubiquinona diretamente para o oxigênio, desviando-os das duas vias de translocação de prótons dos complexos III e IV (Fig. 2). A energia que poderia ser conservada como ATP é liberada como calor. A mitocôndria das plantas também apresenta uma NADH desidrogenase alternativa que é insensível à rotenona, um inibidor do complexo I (veja Tabela 19-4), que transfere elétrons do NADH na matriz diretamente para a ubiquinona, desviando-os do complexo I e seu associado bombeamento de prótons. As mitocôndrias das plantas apresentam ainda uma outra NADH desidrogenase, na face externa da membrana interna, que fica defronte ao espaço intermembranoso e transfere os elétrons do NADPH ou NADH para a ubiquinona, desviando-os novamente do complexo I. Assim, quando os elétrons entram na via respiratória alternativa por meio da NADH desidrogenase insensível à rotenona, à NADH desidrogenase externa ou ao succinato desidrogenase (complexo II) e passam para o O_2 via oxidase alternativa resistente ao cianeto, a energia não é conservada como ATP, mas liberada como calor. A couve malcheirosa pode usar o calor para derreter a neve, produzir um fedor podre ou atrair escaravelhos ou moscas.

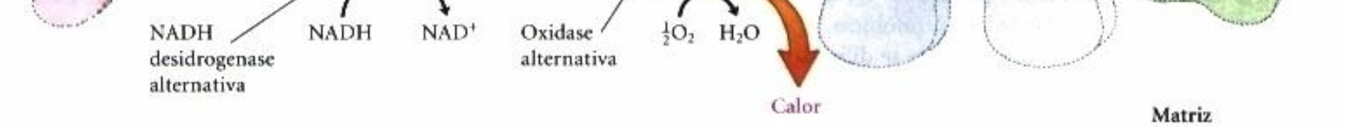


Figura 2 – Carregadores de elétrons da membrana interna da mitocôndria das plantas. Os elétrons podem fluir por meio dos complexos I, III e IV, como na mitocôndria dos animais, ou por meio de carregadores alternativos específicos de plantas pelas vias mostradas com setas azuis.

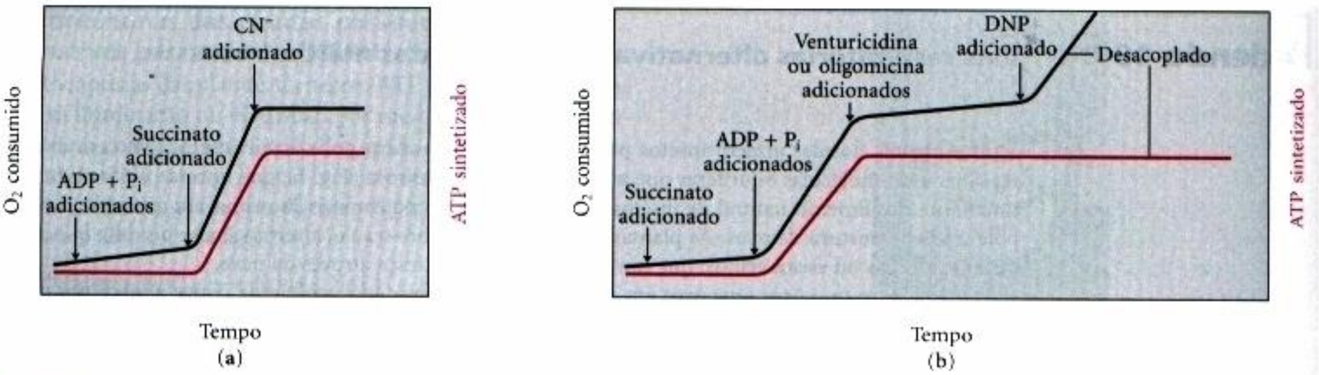


Figura 19-17 – Acoplamento da transferência de elétrons e síntese de ATP na mitocôndria. Em experimentos para demonstrar o acoplamento, as mitocôndrias são suspensas em um meio tamponado e um elétrodo de O_2 é usado para monitorar o consumo de O_2. Em intervalos de tempo determinados, são removidas amostras que são analisadas para se verificar a presença de ATP. **(a)** A adição de apenas ADP e P_i resulta em um pequeno ou nenhum aumento tanto da respiração (consumo de O_2, preto) como da síntese de ATP (vermelho). Quando o succinato é adicionado, a respiração começa imediatamente e o ATP é sintetizado. A adição de cianeto (CN^-), que bloqueia a transferência de elétrons entre a citocromo oxidase e o O_2, inibe tanto a respiração quanto a síntese de ATP. **(b)** Mitocôndrias supridas com succinato respiram e sintetizam ATP apenas quando o ADP e o P_i forem adicionados. A adição subseqüente de venturicidina ou oligomicina, inibidores da ATP sintase, bloqueia tanto a síntese de ATP quanto a respiração. O dinitrofenol (DNP) é um desacoplador e permite que a respiração continue sem a síntese de ATP.

gam à ATP sintase na mitocôndria. Esses compostos são potentes inibidores da síntese de ATP e da transferência de elétrons por meio da cadeia de carregadores para o O_2 (Fig. 19-17b). Como já é conhecido que a oligomicina não interage diretamente com os carregadores de elétrons, mas somente com a ATP sintase, a transferência de elétrons e a síntese de ATP são obrigatoriamente acopladas, isto é, uma não ocorre sem a outra.

A teoria quimiosmótica explica prontamente a dependência da síntese de ATP na mitocôndria do transporte de elétrons. Quando o fluxo de prótons para o interior da matriz através do canal de prótons da ATP sintase é bloqueado (com oligomicina por exemplo), não existe nenhum caminho para o retorno dos prótons para a matriz, e a contínua extrusão de prótons, provocada pela atividade da cadeia respiratória, gera um grande gradiente de prótons. A força próton motriz aumenta até que o custo (energia livre) do bombeamento de prótons para fora da matriz contra esse gradiente se iguale ou exceda à energia liberada pela transferência dos elétrons do NADH para o O_2. Nesse ponto, o fluxo de elétrons cessa, a energia livre do processo de fluxo de elétrons acoplado ao bombeamento de prótons torna-se zero e o equilíbrio é estabelecido.

Entretanto, certas condições e reagentes podem desacoplar a oxidação da fosforilação. Quando mitocôndrias intactas são rompidas com detergentes ou cisalhamento físico, os fragmentos de membrana resultantes ainda podem catalisar a transferência de elétrons do succinato ou NADH para o O_2, mas nenhuma síntese de ATP é acoplada a essa respiração. Certos compostos químicos causam o desacoplamento sem romper a estrutura mitocondrial. Entre os desacopladores químicos estão incluídos o 2,4-dinitrofenol (DNP) e a carbonilcianeto-*p*-trifluormetoxifenilidrazina (FCCP) (Tabela 19-4; Fig. 19-18), ambos ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas. A hidrofobicidade desses compostos permite que eles se difundam rapidamente através da membrana da mitocôndria. Após entrarem na matriz mitocondrial na forma protonada, eles podem liberar um próton, dissipando assim o gradiente de prótons. Ionóforos, tais como a valinomicina (veja Fig. 12-37; Tabela 19-4), permitem que íons inorgânicos passem facilmente através das membranas. Os ionóforos desacoplam a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa, dissipando a contribuição elétrica do gradiente eletroquímico através da membrana da mitocôndria.

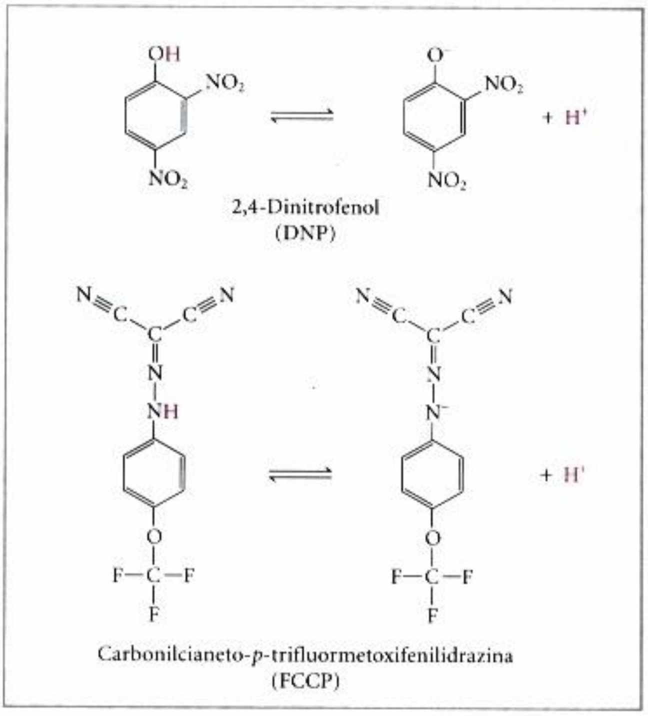


Figura 19-18 – Dois desacopladores químicos da fosforilação oxidativa. Tanto o DNP como o FCCP possuem um próton dissociável e são muito hidrofóbicos. Eles carregam prótons através da membrana mitocondrial interna, dissipando o gradiente de prótons. Eles também desacoplam a fotofosforilação (pág. 553).

Se o papel da transferência de elétrons na síntese de ATP mitocondrial é apenas bombear prótons para criar o potencial da força próton motriz, um gradiente de prótons, criado artificialmente, deveria ser capaz de substituir a transferência de elétrons para conduzir a síntese de ATP. Essa predição do modelo quimiosmótico foi testada e confirmada experimentalmente (Fig. 19-19). Mitocôndrias manipuladas, de modo a se impor uma diferença de concentração de prótons e uma separação de cargas através da membrana interna, sintetizam ATP *na ausência de um substrato oxidável*. A força próton motriz sozinha é suficiente para conduzir a síntese de ATP.

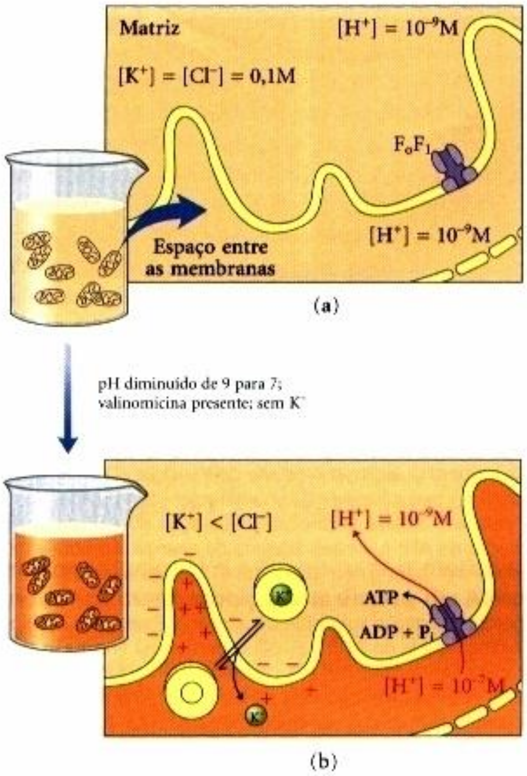


Figura 19-19 – Evidência do papel do gradiente de próton na síntese de ATP. Um gradiente eletroquímico imposto artificialmente comanda a síntese de ATP na ausência de um substrato oxidável como um doador de elétrons. Nesse experimento de duas etapas, mitocôndrias isoladas são inicialmente incubadas em um tampão de pH 9,0 contendo KCl 0,1M. (**a**) Um lento vazamento do tampão e do KCl para o interior da mitocôndria eventualmente provoca um equilíbrio da matriz com o meio circunvizinho. Não estão presentes substratos oxidáveis. (**b**) As mitocôndrias são agora separadas do tampão de pH 9,0 e ressuspensas em um tampão de pH 7,0 contendo valinomicina, mas não KCl. A mudança de tampão cria uma diferença de duas unidades de pH através da membrana interna da mitocôndria. O fluxo de K^+ para fora, sem o seu contra-íon e contra o seu gradiente de concentração, promovido pela valinomicina, cria um desbalanceamento de cargas através da membrana (matriz negativa). A soma do potencial químico, devido à diferença de pH, com o potencial elétrico, devido à separação de cargas, é uma força próton motriz suficientemente grande para suportar a síntese de ATP na ausência de um substrato oxidável.

A ATP sintase possui dois domínios funcionais, F_o e F_1

A ATP sintase mitocondrial é uma ATPase do tipo F (veja Fig. 12-31c; Tabela 12-4), similar na estrutura e no mecanismo às ATP sintases de cloroplastos e bactérias. Esse grande complexo enzimático da membrana mitocondrial interna catalisa a formação de ATP a partir de ADP e P_i acompanhado do fluxo de prótons do lado P para o N da membrana (Eq. 19-10). A ATP sintase, também chamada complexo V, apresenta dois componentes distintos: F_1, uma proteína periférica de membrana, e F_o, uma proteína integral de membrana. A letra *o* subscrita em F_o significa sensível à oligomicina. F_1 foi o primeiro fator identificado como essencial para a fosforilação oxidativa. Ele foi identificado e purificado a partir da membrana mitocondrial interna por Efraim Racker e seus colaboradores no início dos anos 1960. *In vitro*, pequenas vesículas formadas a partir da membrana mitocondrial interna promovem a síntese de ATP acoplada à transferência de elétrons. Quando F_1 é extraído cuidadosamente dessas vesículas, as vesículas "despojadas" ainda contêm as cadeias respiratórias intactas e a porção F_o da ATP sintase. Essas vesículas podem catalisar a transferência de elétrons do NADH para o O_2, mas não podem produzir um gradiente de prótons: F_o apresenta um poro de prótons através do qual esses prótons vazam tão rapidamente quanto são bombeados pela transferência de elétrons e, sem um gradiente de prótons, as vesículas desprovidas do componente F_1 não podem fazer ATP. Isoladamente, o componente F_1 catalisa a hidrólise do ATP (o reverso da síntese) e, por isso, foi originalmente chamado **F_1ATPase**. Quando purificado e adicionado às vesículas "despojadas", ele se reassocia ao componente F_o, fechando seu poro de prótons e restaurando a capacidade da membrana de acoplar a transferência de elétrons e a síntese de ATP.

Efraim Racker
(1913-1991)

O ATP é estabilizado em relação ao ADP, na superfície de F_1

Experimentos de troca isotópica, usando F_1 purificado, revelam um fato notável sobre o mecanismo catalítico da enzima: na sua superfície, a reação $ADP + P_i \rightleftharpoons ATP + H_2O$ é rapidamente reversível, isto é, a variação da energia livre para a síntese de ATP é próxima de zero! Quando o ATP é hidrolisado por F_1 (o reverso da síntese de ATP) em água marcada com ^{18}O, o P_i que é formado apresenta o átomo ^{18}O. Medidas cuidadosas do teor de ^{18}O no P_i, formado *in vitro* pela hidrólise enzimática do ATP catalisada pela F_1, revelam que o P_i contém não um, mas três ou quatro átomos de ^{18}O (Fig. 19-20). Isso indica que a ligação pi-

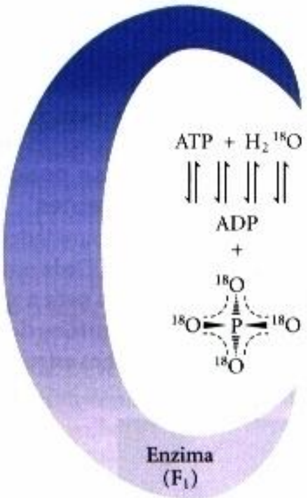


Figura 19-20 – Mecanismo catalítico de F_1: experimento de troca com ^{18}O. F_1 solubilizado de membrana mitocondrial é incubado com ATP na presença de água marcada com ^{18}O. Em intervalos de tempo definidos, uma mostra é retirada da solução e analisada para a incorporação do ^{18}O no P_i produzido pela hidrólise do ATP. Em minutos, o P_i apresenta três ou quatro ^{18}O, indicando que tanto a hidrólise quanto a síntese do ATP ocorreram várias vezes durante o período de incubação.

rofosfato terminal do ATP é quebrada e refeita repetidamente antes que o P_i deixe a superfície da enzima. Com o P_i livre para se movimentar em seu sítio de ligação, cada hidrólise insere ao acaso o ^{18}O em cada uma das quatro posições no P_i. Essa reação de troca ocorre nos complexos F_oF_1 não energizados (sem nenhum gradiente de prótons) e com o complexo F_1 isolado, pois não requer aplicação de energia.

Estudos cinéticos das velocidades de síntese e hidrólise do ATP confirmam a conclusão de que o $\Delta G'^{\circ}$ para síntese do ATP na enzima é próxima de zero. Por meio de medidas de velocidade de hidrólise ($k_1 = 10s^{-1}$) e síntese ($k_{-1} = 24s^{-1}$), a constante de equilíbrio calculada para a reação

$$\text{Enz-ATP} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{Enz-(ADP + P}_i\text{)}$$

é:

$$K_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{24s^{-1}}{10s^{-1}} = 2{,}4$$

A partir desta K_{eq}, o $\Delta G'^{\circ}$ é próximo de zero. Isso contrasta com a K_{eq} da ordem de 10^5 ($\Delta G'^{\circ} = -30{,}5$kJ/mol) para o ATP livre em solução (não na superfície da enzima).

O que explica essa enorme diferença? A ATP sintase estabiliza o ATP em relação ao ADP + P_i ligando mais fortemente o ATP e liberando energia suficiente para contrabalançar o custo de fazer ATP. Medidas cuidadosas das constantes de ligação mostram que a F_oF_1 liga o ATP com uma afinidade muito grande ($K_d \leq 10^{-12}$M) e o ADP com uma afinidade muito menor ($K_d \approx 10^{-5}$M). Essa diferença no K_d corresponde a uma diferença de cerca de 40kJ/mol na energia de ligação, e essa energia de ligação desloca o equilíbrio na direção da formação do produto ATP.

O gradiente de prótons direciona a liberação de ATP da superfície da enzima

Embora a ATP sintase equilibre o ATP com o ADP + P_i sintetizado de novo, o ATP não pode deixar a superfície da enzima na ausência de um gradiente de prótons. É esse gradiente de prótons que ajuda a enzima a liberar o ATP formado em sua superfície. O diagrama de coordenadas de reação do processo (Fig. 19-21) ilustra a diferença entre o mecanismo da síntese do ATP e aquele de várias outras enzimas que catalisam reações endergônicas.

Para a síntese contínua de ATP, a enzima deve oscilar entre a forma que liga o ATP muito firmemente e a forma que libera o ATP. Estudos químicos e cristalográficos da ATP sintase mostraram a base estrutural para essa alternância de função.

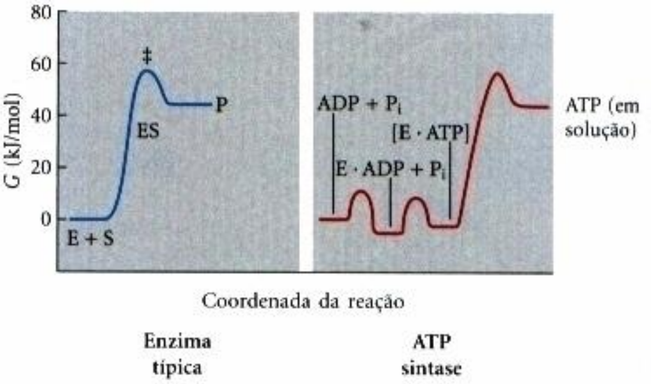
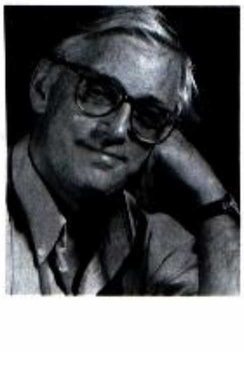


Figura 19-21 – Diagrama de coordenadas da reação para a ATP sintase e uma enzima típica. Em uma reação catalisada por uma enzima típica (à esquerda), alcançar o estado de transição (‡) entre o substrato e o produto é a maior barreira de energia a ser sobrepujada. Na reação catalisada pela ATP sintase (à direita), a liberação do ATP da enzima, e não a formação do ATP, é a maior barreira de energia. Embora a mudança de energia livre para a formação do ATP, a partir do ADP + P_i em solução aquosa, seja grande e positiva, a forte ligação do ATP à enzima garante energia de ligação suficiente para levar a energia do ATP ligado à enzima próxima àquela do ADP + P_i. Na superfície da enzima, a reação é portanto rapidamente reversível e a constante de equilíbrio é aproximadamente 1. A energia livre requerida para a liberação do ATP é garantida pela força próton motriz.

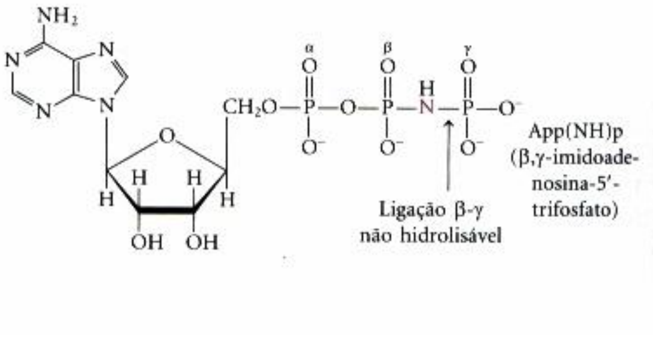
Cada subunidade β da ATP sintase pode assumir três configurações diferentes

A F_1 mitocondrial apresenta nove subunidades de cinco tipos diferentes, com a composição $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Cada uma das três subunidades β apresenta um sítio catalítico para a síntese do ATP. A determinação cristalográfica da estrutura de F_1 por John E. Walker e colaboradores revelou detalhes estruturais muito úteis para explicar o mecanismo catalítico da enzima. A parte de F_1 em forma de maçaneta é uma esfera achatada de 8nm de altura e 10nm de espessura, consistindo em subunidades α e β alternadas arranjadas semelhantemente aos gomos de uma laranja (Fig. 19-22a, b, c). Os polipeptídeos que formam o caule na estrutura cristalina de F_1 estão arranjados assimetricamente, com um domínio de uma única subunidade γ que caracteriza uma haste que atravessa F_1 e um outro domínio de γ primariamente associado a uma das três subunidades β, designada β-vazia (Fig. 19-22c). Embora a seqüência de aminoácidos das três subunidades β sejam idênticas, as suas conformações são diferentes, em parte, devido à associação da subunidade γ com apenas uma das três. As estruturas das subunidades δ e ε não foram reveladas nesses estudos cristalográficos.

As diferenças conformacionais entre as subunidades β se ampliam para diferenças nos sítios de ligação do ATP/ADP. Quando os pesquisadores cristalizaram a proteína na presença de ADP e App(NH)p, um análogo estrutural muito parecido com o ATP que não pode ser hidrolisado pela atividade ATPase de F_1, o sítio de ligação de uma das três subunidades β foi ocupado pelo App(NH)p, o segundo foi ocupado pelo ADP e o terceiro ficou vazio (Fig. 19-22c). As correspondentes conformações da subunidade β foram designadas β-ATP, β-ADP e β-vazia. Essa diferença na ligação do nucleotídeo entre as três subunidades é crítica para o mecanismo desse complexo.



John E. Walker


NH_2
N
N
N
N
O
H
H
H
H
OH
OH
CH_2O
α
β
γ
O
P
H
N
O^-
Ligação β-γ não hidrolisável
App(NH)p (β,γ-imidoadenosina-5'-trifosfato)

O complexo F_o que constitui o poro de prótons é composto de três subunidades a, b e c em uma proporção ab_2c_{10-12}. A subunidade c é um polipeptídeo pequeno (M_r 8.000) muito hidrofóbico, constituído fundamentalmente por duas hélices transmembrana, com uma pequena volta se projetando do lado da matriz na membrana. A estrutura cristalina da F_oF_1 de levedura, deduzida em 1999, mostra o arranjo das subunidades c. Existem 10 subunidades c nas leveduras, cada uma com duas hélices transmembrana quase perpendiculares ao plano da membrana e arranjadas em dois círculos concêntricos (Fig. 19-22d, e). O círculo interior é composto das hélices aminoterminal de cada subunidade c. O círculo exterior, de cerca de 55Å de diâmetro, é formado pelas hélices caboxiterminais. As subunidades ε e γ de F_1 formam uma perna-e-pé que se projeta do fundo (membrana) da F_1 e se apóia firmemente no anel das subunidades c. Um desenho esquemático (Fig. 19-22f) combina a informação estrutural dos estudos da F_oF_1 bovina e de levedura.

A catálise rotacional é a chave para o mecanismo de mudança de ligação para a síntese do ATP

Baseado em detalhados estudos cinéticos e de associação de ligantes, da reação catalisada pela F_oF_1, Paul Boyer propôs um mecanismo no qual os três sítios ativos de F_1 giram catalisando a síntese de ATP (Fig. 19-23). Uma subunidade β começa na conformação β-ADP, que liga ADP e P_i do meio circunvizinho. A subunidade muda então de conformação, assumindo a forma β-ATP, que liga firmemente e estabiliza o ATP, efetuando um equilíbrio imediato do ADP + P_i com o ATP na superfície da enzima. Finalmente, a subunidade muda para a conformação β-vazia, que tem baixa afinidade pelo ATP, e o recém-sintetizado ATP deixa a superfície da enzima. Uma nova rodada da catálise começa quando essa subunidade assume a forma β-ADP e liga ADP e P_i.

Paul Boyer

As mudanças conformacionais fundamentais para esse mecanismo são dirigidas pela passagem dos prótons através da porção F_o da ATP sintase. A corrente de prótons através do "poro" F_o provoca a rotação do cilindro de subunidades c e da subunidade γ a ele ligada, ao redor do eixo da subunidade γ, que é perpendicular ao plano da membrana. A subunidade γ atravessa o centro do esferóide $\alpha_3\beta_3$ que é mantido estacionário em relação à superfície da membrana pelas subunidade b_2 e δ (Fig. 19-22f). A cada 120° de rotação, γ entra em contato com uma subunidade β diferente e esse contato força essa subunidade β a assumir a conformação β-vazia.

As três subunidades β interagem de tal modo que, quando uma assume a conformação β-vazia, a sua vizinha de um lado *deve* assumir a forma β-ADP, e a outra vizinha, a forma β-ATP. Desse modo, uma rotação completa da subunidade γ provoca uma mudança da subunidade β nas três conformações possíveis e, a cada rotação completa, três ATP são sintetizados e liberados na superfície da enzima.

Uma forte predição desse modelo de mudança de ligação é que a subunidade γ deve rodar em uma direção quando F_oF_1 está sintetizando ATP, e, na direção oposta, quando a enzima está hidrolisando ATP. Essa predição foi confirmada por meio de experimentos elegantes nos laboratórios de Masamitsu Yoshida e Kazuhiko Kinoshita Jr. A rotação de γ em uma única molécula de F_1 foi detectada microscopicamente ligando-se um longo, fino e fluorescente polímero de actina à γ e a aguardando a mover-se em relação à $\alpha_3\beta_3$ imobilizada em uma lâmina de microscópio, à medida que o ATP era hidrolisado. Quando todo o complexo F_oF_1 (e não apenas F_1) foi usado em um experimento similar, o anel de subunidade c girou com γ (Fig. 19-24). A "haste" girou na direção prevista de 360°. A rotação não foi tão regular, mas ocorreu em três discretos passos de 120°. Conforme já calculado a partir da velocidade de hidrólise do ATP por uma molécula de F_1 e o arraste friccional no longo polímero de actina, a eficiência desse mecanismo em converter energia química em movimento é quase 100%. Segundo Boyer, ela é "uma esplêndida máquina molecular".

O acoplamento quimiosmótico acarreta uma estequiometria não inteira de consumo de O_2 e síntese de ATP

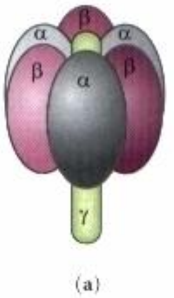
Antes da aceitação geral do modelo quimiosmótico para a fosforilação oxidativa, assumia-se que a equação da reação global teria a seguinte forma:

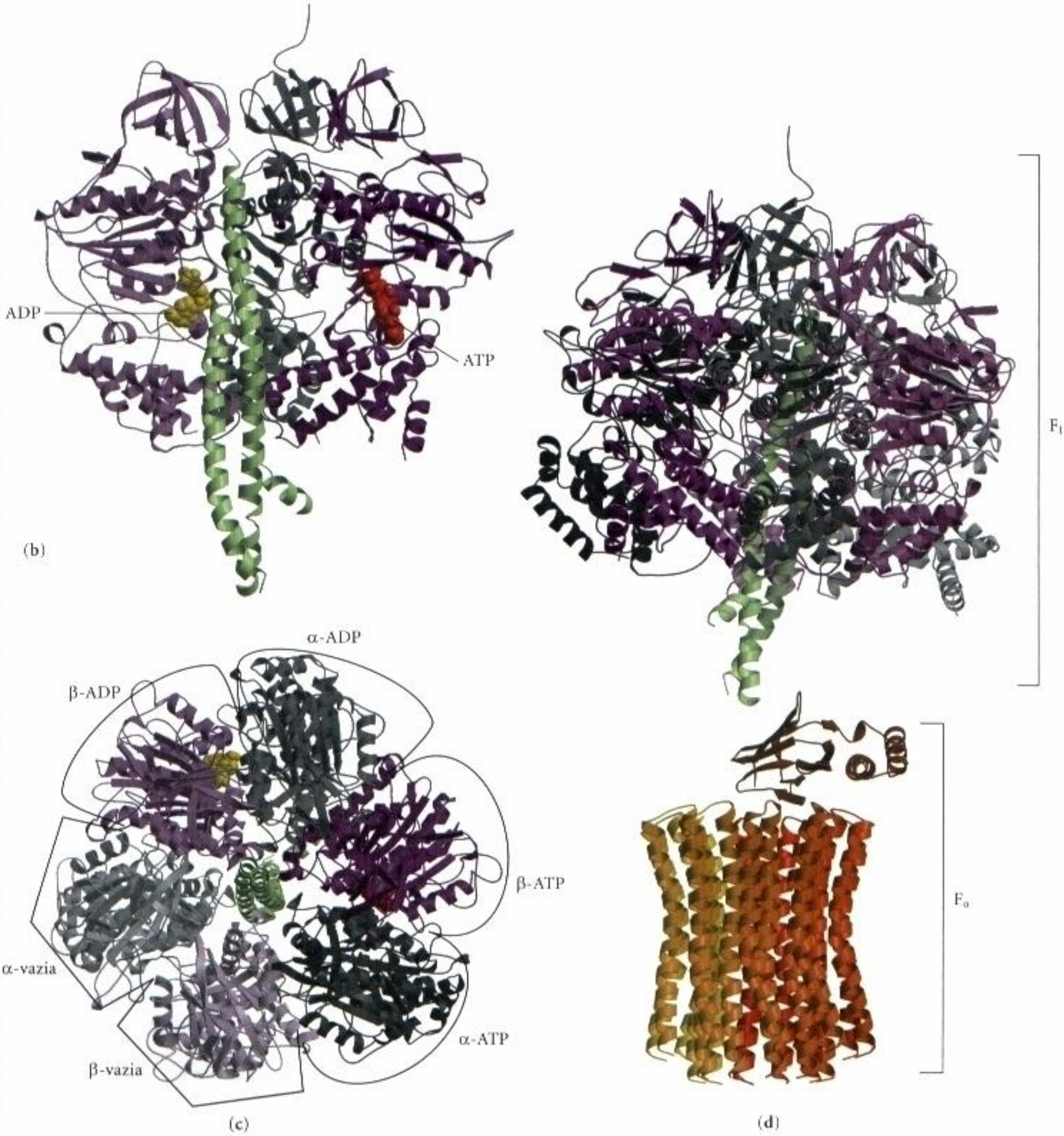
$$\text{ADP} + \text{P}_i + x(\tfrac{1}{2})\text{O}_2 + x\text{H}^+ + x\text{NADH} \longrightarrow \text{ATP} + x\text{H}_2\text{O} + x\text{NAD}^+ \quad (19\text{-}11)$$

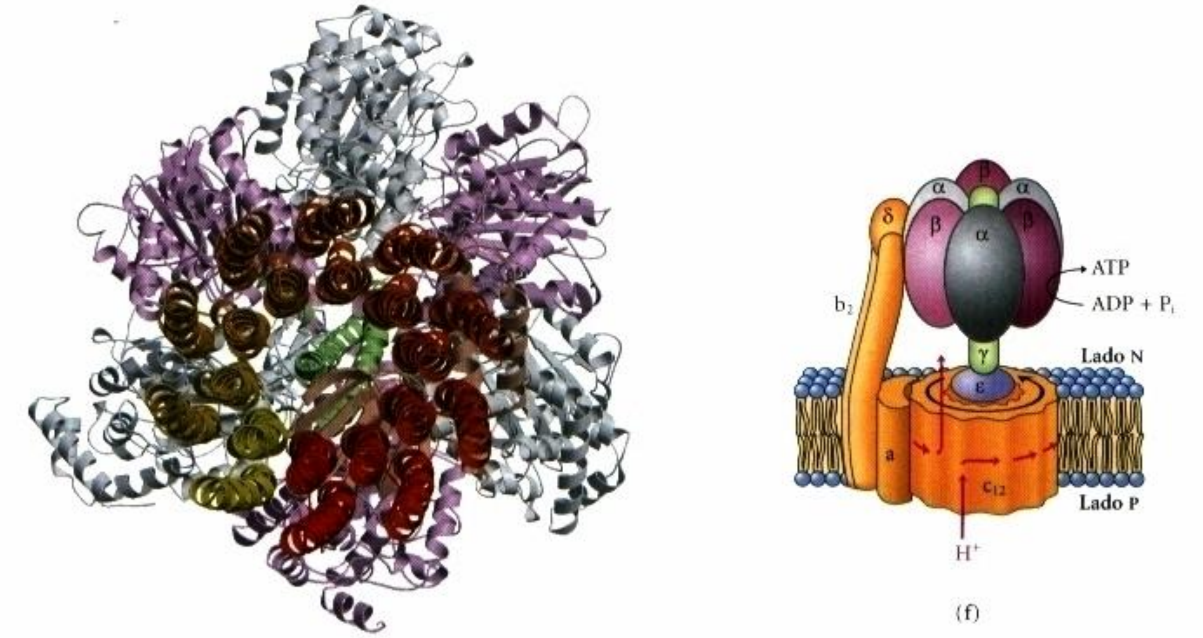
onde o valor de *x*, às vezes chamado **razão P/O ou razão $P/2e^-$**, sempre era um número inteiro. Quando mitocôndrias intactas são suspensas em uma solução contendo um substrato oxidável tal como o succinato ou NADH e é fornecido O_2, a síntese de ATP, bem como a diminuição do O_2, podem ser medidas rapidamente. Entretanto, a medida de P/O é complicada pelo fato de que a mitocôndria intacta consome ATP em muitas reações que ocorrem na matriz e consome O_2 para propósitos outros que não a fosforilação oxidativa. A maioria dos experimentos produz razões P/O (ATP para $\frac{1}{2}O_2$) maiores que 2, quando o NADH é o doador de elétrons, e maiores que 1, quando o succinato é o doador. Considerado-se que P/O deve ser um valor inteiro, a maioria dos pesquisadores concorda que a razão P/O deveria ser 3 para o NADH e 2 para o succinato. Durante anos, esses valores foram encontrados em artigos de pesquisas e em livros-texto.

Com a introdução do paradigma quimiosmótico para o acoplamento da síntese do ATP à transferência de elétrons, não existe nenhum requisito teórico para a razão P/O ser inteira. As questões relevantes sobre a estequiometria tornam-se: quantos prótons são bombeados para fora por meio da transferência de elétrons de um NADH para o O_2 e quantos prótons devem entrar por meio do complexo F_oF_1 para proporcionar a síntese de uma molécula de ATP? A medida do fluxo de prótons é tecnicamente complicada. Deve-se levar em consideração a capacidade tamponante da mitocôndria, o vazamento não produtivo de prótons através da membrana interna e o uso do gradiente de prótons para funções diferentes da síntese de ATP, como, por exemplo, o transporte de substratos através da membrana mitocondrial (descrito a seguir). O valor de consenso para os prótons bombeados para fora por par de elétrons é 10 para o NADH e 6 para o succinato. O valor experimental mais aceito para o número de prótons requeridos para proporcionar a síntese de uma molécula de ATP é 4, dos quais 1 é usado para transportar P_i, ATP e ADP através da membrana mitocondrial (veja a seguir). Se 10 prótons são bombeados para fora por molécula de

Figura 19-22 – Complexo da ATP sintase mitocondrial. (**a**) Estrutura do complexo F_1 deduzida a partir de estudos cristalográficos e bioquímicos. Na F_1, três subunidades α e três β estão arranjadas como os gomos de uma laranja, com alternância das subunidades α (sombreado cinza) e β (sombreado púrpura) ao redor de uma haste central, a subunidade γ (verde). (**b**) Estrutura cristalina de F_1 vista de lado. Duas subunidades α e uma β foram removidas para mostrar a haste central (subunidade γ) e os sítios de ligação para o ATP (vermelho) e ADP (amarelo) nas subunidades β. As subunidade δ e ε não estão mostradas aqui. (**c**) F_1 vista por cima (isto é, do lado N da membrana), mostrando as três subunidades α, as três β e a haste central (subunidade γ). Em cada subunidade β, perto da sua interface com a subunidade α vizinha, existe um sítio de ligação para o nucleotídeo que é crítico para a atividade catalítica. A única subunidade γ associa-se fundamentalmente a um dos três pares $\alpha\beta$, forçando cada uma das três subunidades β a assumir conformações ligeiramente diferentes, com diferentes sítios de ligação para nucleotideos. Na enzima cristalina, uma subunidade (β-ADP) apresenta o ADP (amarelo) em seu sítio de ligação, a próxima (β-ATP) contém o ATP (vermelho), e a terceira (β-vazia) não contém nenhum nucleotídeo ligado. (**d**) Vista lateral da estrutura da F_oF_1. Trata-se de uma composição, na qual as coordenadas cristalográficas da F_1 mitocondrial bovina (sombreadas em púrpura e cinza) foram combinadas com as da F_o mitocondrial de levedura (sombreadas em amarelo e laranja). As subunidades a, b, γ e ε não fazem parte da estrutura cristalina mostrada aqui. *(Continua, pág. seguinte.)*







(e)

(f)

Figura 19-22 (*continuação*) – (**e**) Estrutura da F_oF_1 de levedura vista a partir da base na direção do lado P para o lado N. As estruturas maiores, visíveis nesta secção transversal, são as duas hélices transmembrana de cada uma das dez subunidades c arranjadas em círculos concêntricos. (**f**) Estrutura do complexo F_oF_1 deduzida a partir de estudos bioquímicos e cristalográficos. As duas subunidades b de F_o se associam firmemente às subunidades α e β de F_1, mantendo-as fixas em relação à membrana. Em F_o, o cilindro de subunidades c, embebido na membrana, está ligado à haste constituída pelas subunidades γ e ε de F_1. À medida que os prótons fluem através da membrana do lado P para o lado N, via F_o, o cilindro e a haste rodam e as subunidades β de F_1 mudam de conformação à medida que a subunidade γ se associa a cada uma delas.

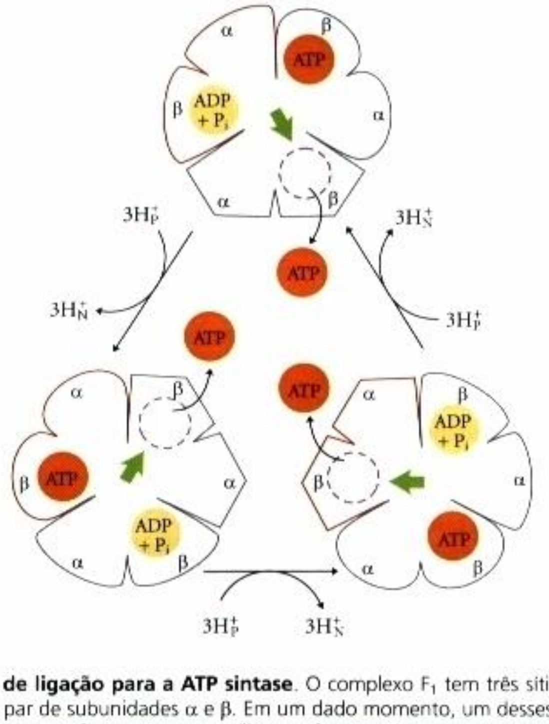


Figura 19-23 – Modelo da mudança de ligação para a ATP sintase. O complexo F_1 tem três sítios não equivalentes para a ligação dos nucleotídeos de adenina, um para cada par de subunidades α e β. Em um dado momento, um desses sítios está na conformação β-ATP (que liga ATP firmemente), um segundo está na conformação β-ADP (ligação fraca) e um terceiro está na conformação β-vazia (ligação muito fraca). A força próton motriz provoca a rotação da haste central (a subunidade γ, mostrada como uma seta verde) que entra em contato com cada um dos pares de subunidades αβ sucessivamente. Isso acarreta uma mudança conformacional cooperativa, na qual o sítio β-ATP é convertido na conformação β-vazia e o ATP é liberado. O sítio β-ADP é convertido na conformação β-ATP que promove a condensação de ADP + P_i, ligados a ela, para formar ATP. A conformação β-vazia se transforma em um sítio β-ADP, que liga fracamente ADP e P_i provenientes do solvente. O modelo, baseado em resultados experimentais, requer que, pelo menos, dois dos três sítios catalíticos se alternem em atividade. O ATP não pode ser liberado de um sítio se e até que ADP e P_i estejam ligados ao outro sítio.

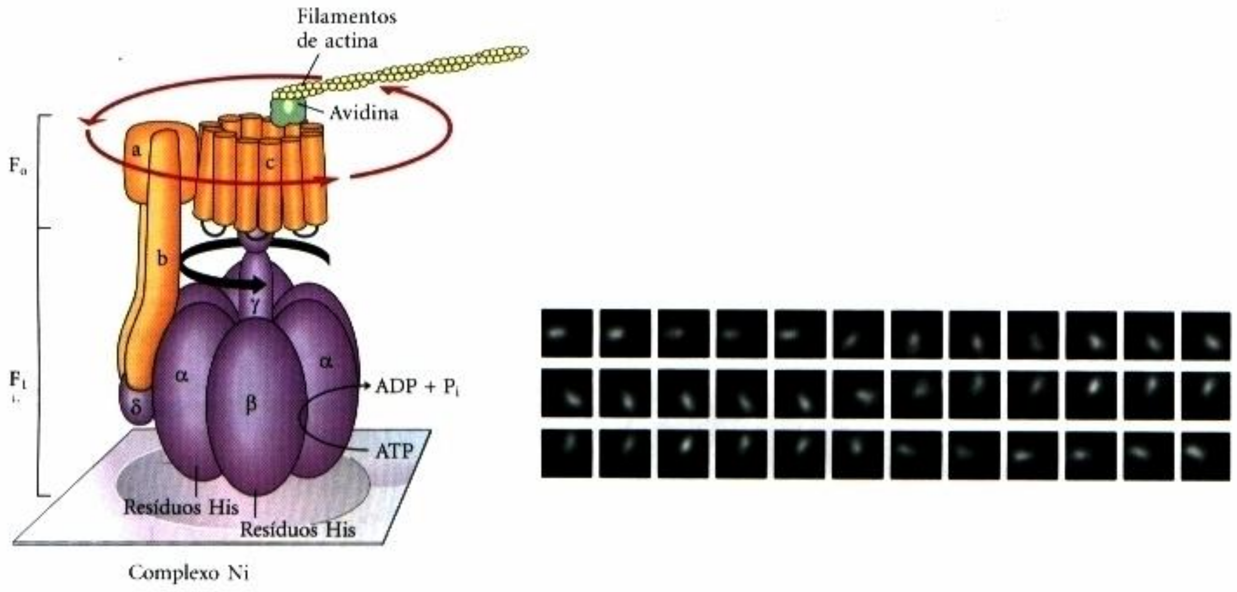


Figura 19-24 – Demonstração experimental da rotação de F_o e γ. F_1, geneticamente construída, contendo um certo número de resíduos de His, adere firmemente a uma lâmina de microscópio coberta com um complexo de Ni. A biotina é ligada covalentemente à subunidade c. A proteína avidina, que se liga firmemente à biotina, é ligada covalentemente a longos filamentos de actina marcados com uma sonda fluorescente. A ligação da biotina à avidina une os filamentos de actina com a subunidade c. Quando o ATP é adicionado para estimular a atividade ATPase da F_1, observa-se o filamento marcado girar continuamente em uma direção, demonstrando que o cilindro de subunidades c de F_o gira. Em outro experimento (não mostrado), a ligação do filamento de actina diretamente na subunidade γ mostrou que ela também gira. Provavelmente, o cilindro e a haste se movem como uma unidade.

NADH e 4 devem entrar para produzir um ATP, a razão P/O baseada em prótons é 2,5 para o NADH como doador de elétrons e 1,5 (6/4) para o succinato. Serão usados os valores de P/O de 2,5 e 1,5 ao longo deste livro, mas os valores 3,0 e 2,0 ainda são encontrados na literatura bioquímica. A palavra final acerca da estequiometria de prótons provavelmente não será escrita até que os detalhes completos do mecanismo de reação da F_oF_1 sejam conhecidos.

A força próton motriz energiza o transporte ativo

Embora o papel primário do gradiente de prótons na mitocôndria é fornecer energia para a síntese do ATP, a força próton motriz também comanda vários processos de transporte essenciais à fosforilação oxidativa. A membrana mitocondrial interna geralmente é impermeável a espécies carregadas, exceto para dois sistemas específicos da membrana, o transporte de ADP e P_i para dentro da matriz e o do ATP para fora, no citosol (Fig. 19-25).

A **adenina nucleotídeo translocase**, embebida na membrana interna, liga o ADP^{3-} no espaço intermembranoso e o transporta para a matriz, trocando-o com uma molécula de ATP^{4-}, que é transportada simultaneamente para fora (veja Fig. 14-1 para as formas iônicas do ATP e ADP). Como esse contratransporte desloca quatro cargas negativas para fora, para cada três transportadas para dentro, sua atividade é favorecida pelo gradiente eletroquímico transmembrana, que acarreta uma carga negativa líquida à matriz. A força próton motriz direciona a troca ATP-ADP. A adenina nucleotídeo translocase é especificamente inibida pelo atractilosídeo, um glicosídeo tóxico formado por uma espécie de cardo. Se o transporte de ADP para dentro da mitocôndria e o do ATP para fora é inibido, o ATP citosólico não pode ser regenerado a partir do ADP, explicando a toxicidade do atractilosídeo (Tabela 19-4). Um segundo sistema de transporte de membrana essencial para a fosforilação oxidativa é a **fosfato translocase**, que promove o co-transporte de um $H_2PO_4^-$

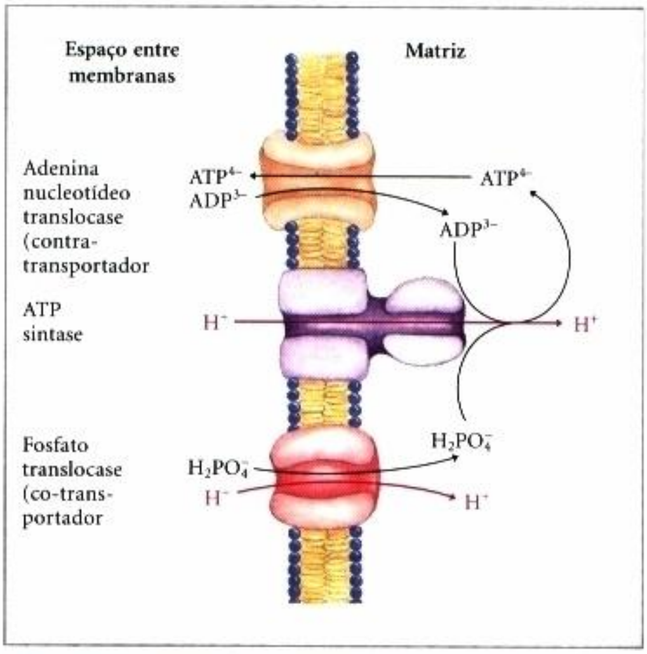


Figura 19-25 – Adenina nucleotídeo e fosfato translocases. Os sistemas de transporte da membrana mitocondrial interna transportam ADP e P_i para dentro da matriz e o ATP recém-sintetizado para o citosol. A adenina nucleotídeo translocase é uma contratransportadora, isto é, a mesma proteína desloca o ADP para dentro da matriz e o ATP para fora. O efeito de substituir o ATP^{4-} pelo ADP^{3-} é o efluxo liquido de uma carga negativa, que é favorecida pela diferença de carga através da membrana interna (lado externo positivo). Em pH 7,0, o P está presente como HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$, e a fosfato translocase é específica para o $H_2PO_4^-$. Não há fluxo líquido de carga durante o co-transporte do HPO_4^{2-} e H^+, mas a concentração relativamente baixa de prótons na matriz favorece o movimento dos íons H^+ para dentro. Assim, a força próton motriz é responsável pelo fornecimento de energia tanto para a sintese do ATP como para o transporte de substratos (ADP e P_i) para dentro e o produto (ATP) para fora da matriz mitocondrial.

e um H^+ para dentro da matriz. Esse processo de transporte também é favorecido pelo gradiente de prótons transmembrana (Fig. 19-25). Observe que ele requer um próton para se mover do lado P para o lado N da membrana interna, consumindo uma parte da energia do transporte de elétrons.

Sistemas de lançadeiras são requeridos para a oxidação mitocondrial do NADH citosólico

A NADH desidrogenase da membrana mitocondrial interna das células animais pode aceitar elétrons apenas do NADH na matriz. Sabendo que a membrana interna não é permeável ao NADH, como o NADH gerado pela glicólise, no citoplasma, pode ser reoxidado a NAD^+ pelo O_2 via cadeia respiratória? Sistemas especiais de lançadeiras transportam os equivalentes redutores do NADH citosólico para dentro da mitocôndria por uma via indireta. A lançadeira de NADH mais ativa, que funciona nas mitocôndrias do fígado, do rim e do coração, é a **lançadeira malato-aspartato** (Fig. 19-26). Os equivalentes redutores do NADH citosólico são inicialmente transferidos ao oxaloacetato citosólico produzindo malato, pela ação da malato desidrogenase citosólica. O malato formado passa através da membrana interna para a matriz, por meio do transportador malato-α-cetoglutarato. Na matriz, os equivalentes redutores são passados para o NAD^+, pela ação da malato desidrogenase matricial, formando o NADH. Esse NADH pode então transferir os seus elétrons diretamente para a cadeia respiratória. Cerca de 2,5 moléculas de ATP são geradas à medida que esse par de elétrons é transferido para o O_2. O oxaloacetato citosólico deve ser regenerado por meio de reações de transaminação para a atividade dos transportadores de membrana começar um outro ciclo.

O músculo esquelético e o cérebro utilizam uma lançadeira de NADH diferente, **lançadeira do glicerol-3-fosfato** (Fig. 19-27). Ela difere da lançadeira malato-aspartato pelo fato de ceder os equivalentes redutores do NADH (via ubiquinona) para o complexo III e não o I (Fig. 19-8), fornecendo, assim, energia suficiente para sintetizar apenas 1,5 molécula de ATP para cada par de elétrons.

As mitocôndrias das plantas superiores possuem uma NADH desidrogenase orientada *externamente*, que pode transferir os elétrons diretamente do NADH citosólico para a cadeia respiratória, no nível da ubiquinona. Uma vez que essa via desvia esses elétrons da NADH desidrogenase e do movimento de prótons a ela associado, a produção de ATP a partir do NADH citosólico é menor que a do NADH gerado na matriz (Adendo 19-1).

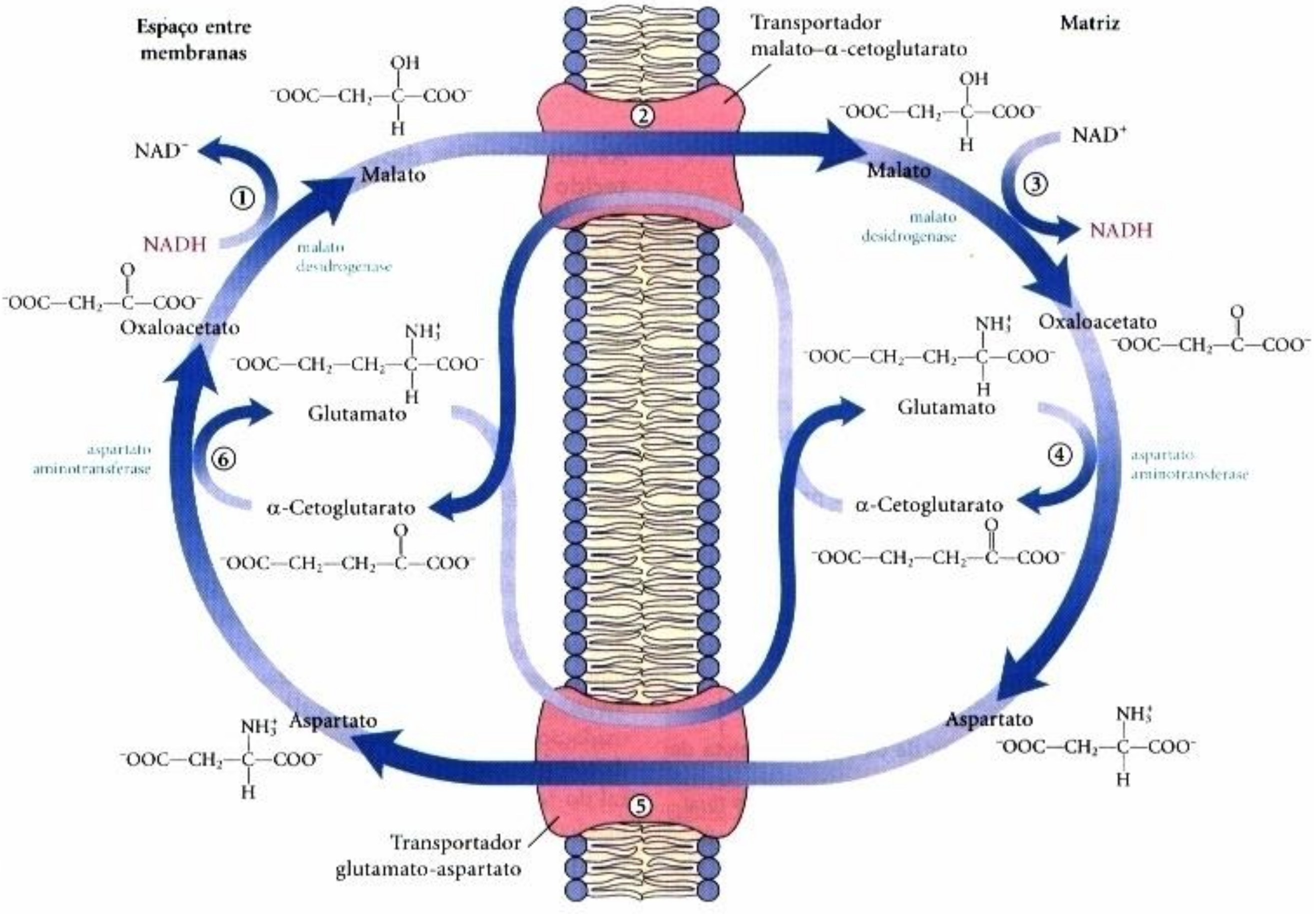

Espaço entre membranas
Transportador malato–α-cetoglutarato
Matriz
⁻OOC—CH₂—C(OH)(H)—COO⁻
②
NAD⁻
Malato
①
NADH
malato desidrogenase
⁻OOC—CH₂—C(=O)—COO⁻
Oxaloacetato
⁻OOC—CH₂—CH₂—C(NH₃⁺)(H)—COO⁻
Glutamato
aspartato aminotransferase
⑥
α-Cetoglutarato
⁻OOC—CH₂—CH₂—C(=O)—COO⁻
NH₃⁺ Aspartato
⁻OOC—CH₂—C(NH₃⁺)(H)—COO⁻
⑤
Transportador glutamato-aspartato
⁻OOC—CH₂—C(OH)(H)—COO⁻
NAD⁺
Malato
③
NADH
malato desidrogenase
Oxaloacetato
⁻OOC—CH₂—C(=O)—COO⁻
⁻OOC—CH₂—CH₂—C(NH₃⁺)(H)—COO⁻
Glutamato
④
aspartato aminotransferase
α-Cetoglutarato
⁻OOC—CH₂—CH₂—C(=O)—COO⁻
Aspartato
⁻OOC—CH₂—C(NH₃⁺)(H)—COO⁻

Figura 19-26 – A lançadeira malato-aspartato. Essa lançadeira para transportar equivalentes redutores do NADH citosólico para a matriz mitocondrial é usada no fígado, nos rins e no coração. ① O NADH citosólico (espaço intermembranoso) cede dois equivalentes redutores para o oxaloacetato, produzindo malato. ② O malato é transportado através da membrana interna pelo transportador malato-α-cetoglutarato. ③ Na matriz, o malato cede dois equivalentes redutores ao NAD^+ e o NADH resultante é oxidado pela cadeia respiratória. O oxaloacetato formado a partir do malato não pode passar diretamente para o citosol. Ele primeiramente é transaminado a aspartato ④, que passa para o citosol por meio do transportador glutamato-aspartato ⑤. O oxaloacetato é regenerado no citosol ⑥, completando o ciclo.

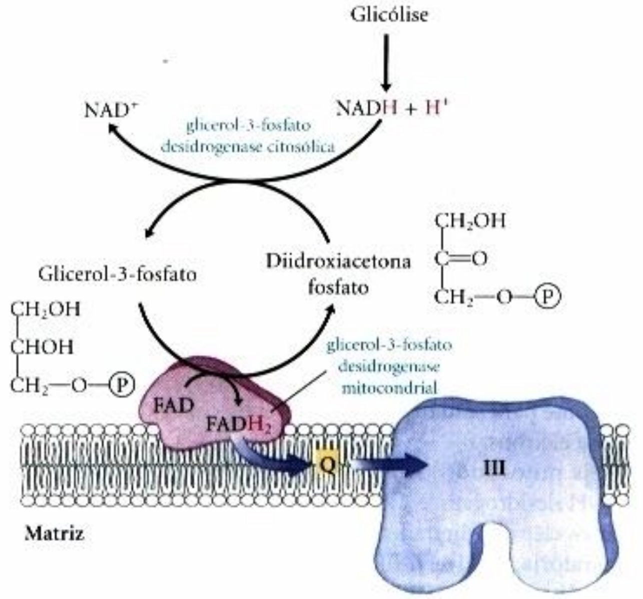


Figura 19-27 – A lançadeira glicerol-3-fosfato. Esse meio alternativo de deslocar equivalentes redutores do citosol para a matriz mitocondrial opera no músculo esquelético e no cérebro. No citosol, a diidroxiacetona fosfato aceita dois equivalentes redutores do NADH em uma reação catalisada pela glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica. Uma isoenzima da glicerol-3-fosfato desidrogenase, ligada à superfície externa da membrana interna, transfere dois equivalentes redutores do glicerol-3-fosfato localizado no espaço intermembranoso até a ubiquinona. Observe que esta lançadeira não envolve sistema de transporte através da membrana.

Regulação da Fosforilação Oxidativa

A fosforilação oxidativa produz a maioria do ATP produzido nas células aeróbicas. A oxidação completa de uma molécula de glicose até CO_2 produz 30 ou 32 ATP (Tabela 19-5). Por comparação, em condições anaeróbicas (fermentação láctica), a glicólise produz apenas dois ATP por glicose. Assim, o surgimento da fosforilação oxidativa acarretou um tremendo aumento na eficiência energética do catabolismo. A oxidação completa do palmitoil-CoA, até CO_2, que também ocorre na matriz mitocondrial, produz 108 ATP por palmitoil-CoA (veja Tabela 17-1). Um cálculo similar pode ser feito para o ATP produzido pela oxidação de cada um dos aminoácidos (Capítulo 18). As vias de oxidação aeróbicas que resultam na transferência de elétrons para o O_2 são responsáveis pela maior parte do ATP sintetizado no catabolismo. Desse modo, a regulação da produção de ATP pela fosforilação oxidativa para garantir as necessidades flutuantes da célula por ATP é absolutamente essencial.

Tabela 19-5 – Produção de ATP a partir da oxidação completa da glicose

Processo	Produto direto	ATP final
Glicólise	2 NADH (citosólico)	3 ou 5*
	2 ATP	2
Oxidação do piruvato (dois por glicose)	2 NADH (matriz mitocondrial)	5
Oxidação do acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico (dois por glicose)	6 NADH (matriz mitocondrial)	15
	2 FADH$_2$	3
	2 ATP ou 2 GTP	2
Produção total por glicose		30 ou 32

*O número depende do tipo do sistema de lançadeira que transfere equivalentes redutores na mitocôndria.

A fosforilação oxidativa é regulada pelas necessidades energéticas celulares

A velocidade da respiração (consumo de O_2) na mitocôndria é rigorosamente regulada. Ela geralmente é limitada pela disponibilidade do ADP como substrato para a fosforilação. A dependência da velocidade de consumo de O_2 em relação à disponibilidade do aceptor de P_i, o ADP (veja Fig. 19-17b), chamada **controle aceptor** da respiração pode ser dramática. Em alguns tecidos animais, o **quociente do controle aceptor**, a razão entre a velocidade máxima do consumo de O_2 induzida pelo ADP e a velocidade basal na ausência do ADP é pelo menos 10.

A concentração intracelular do ADP é uma medida do estado energético das células. Uma outra medida relacionada é o **quociente da ação das massas** do sistema ATP-ADP: $[ATP]/([ADP][P_i])$. Normalmente esse quociente é muito alto, de tal modo que o sistema ATP-ADP está quase totalmente fosforilado. Quando a velocidade de algum processo que requer energia (síntese de proteínas, por exemplo) aumenta, a velocidade de transformação do ATP em ADP e P_i aumenta, diminuindo o quociente da ação das massas. Com mais ADP disponível para a fosforilação oxidativa, a velocidade da respiração aumenta, provocando a regeneração do ATP. Isso continua até que o quociente da ação das massas retorne ao seu alto nível normal, instante em que a respiração diminui novamente. A velocidade da oxidação dos combustíveis celulares é regulada com tal sensibilidade e precisão que o quociente $[ATP]/([ADP][P_i])$ varia apenas ligeiramente na maioria dos tecidos, mesmo durante variações extremas na demanda energética. Em resumo, o ATP é formado tão rapidamente quanto é usado nas atividades celulares que requerem energia.

As mitocôndrias desacopladas no tecido adiposo marrom produzem calor

Há uma extraordinária e instrutiva exceção à regra geral de que a respiração diminui quando o suprimento de ATP é adequado. A maioria dos mamíferos recém-nascidos, incluindo o homem, apresenta um tipo de tecido chamado **tecido adiposo marrom**, no qual a oxidação dos combustíveis em vez de produzir ATP serve para gerar calor para manter o recém-nascido aquecido. Esse tecido adiposo especializado é marrom devido a presença de um grande número de mitocôndrias e, portanto, de grandes quantidades de citocromos, cujos grupos heme absorvem intensamente a luz visível.

As mitocôndrias do tecido adiposo marrom são similares àquelas de outras células dos mamíferos em todos os aspectos, exceto que elas apresentam uma notável proteína em suas membranas internas. A **termogenina**, também chamada de **proteína desacopladora** (Tabela 19-4), proporciona uma via para os prótons retornarem à matriz sem passar pelo complexo F_oF_1 (Fig. 19-28). Como resultado desse desvio de prótons, a energia da oxidação não é conservada pela formação do ATP mas é dissipada como calor, que contribui para manter a temperatura corporal do recém-nascido. Os animais que hibernam também dependem das mitocôndrias desacopladas do tecido adiposo marrom para gerar o calor durante o longo período de dormência (veja Adendo 17-1).

As vias de produção do ATP são reguladas de uma maneira coordenada

As principais vias catabólicas possuem mecanismos reguladores coordenados e ajustados, que lhes permitem funcionar conjuntamente de uma maneira econômica e auto-reguladora para produzir ATP e os precursores biossintéticos. As concentrações

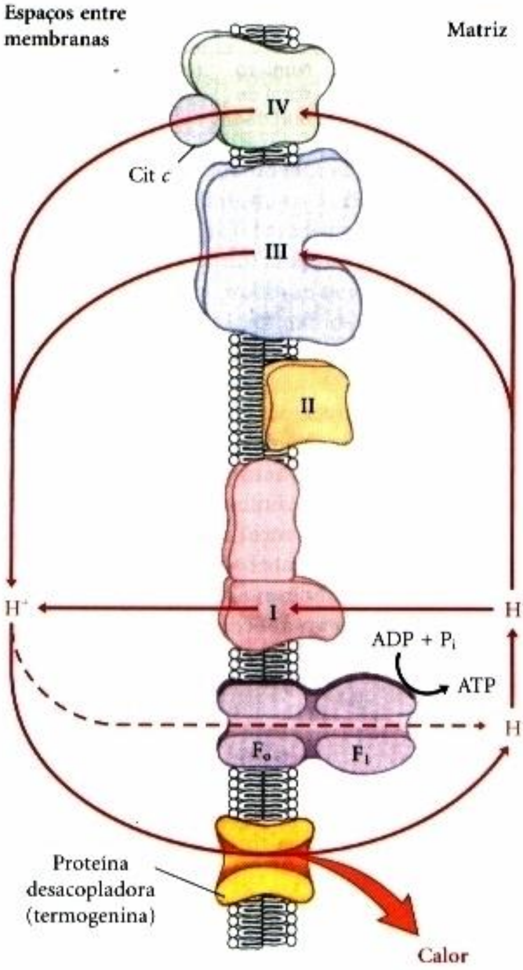

Espaços entre membranas
Matriz
IV
Cit c
III
II
I
H^+
H^+
H^+
ADP + P_i
ATP
F_o
F_1
Proteína desacopladora (termogenina)
Calor

Figura 19-28 – Geração de calor pela mitocôndria desacoplada. A proteína desacopladora (termogenina) das mitocôndrias do tecido adiposo marrom, fornecendo uma via alternativa para os prótons reentrarem na matriz mitocondrial, faz com que a energia conservada pelo bombeamento dos prótons seja dissipada como calor.

relativas de ATP e ADP controlam não apenas as velocidades da transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa, mas também as velocidades do ciclo do ácido cítrico, a oxidação do piruvato e a glicólise (Fig. 19-29). Toda vez que o consumo de ATP aumenta, a velocidade da transferência de elétrons e da fosforilação oxidativa aumenta. Simultaneamente, a velocidade da oxidação do piruvato via ciclo do ácido cítrico aumenta, elevando dessa forma o fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Esses eventos podem, por sua vez, provocar um aumento na velocidade da glicólise, aumentando a velocidade da formação do piruvato. Quando a conversão do ADP em ATP diminui a concentração do ADP, o controle aceptor diminui a transferência de elétrons e, portanto, a fosforilação oxidativa. A glicólise e o ciclo do ácido cítrico também diminuem, uma vez que o ATP é um inibidor alostérico da fosfofrutoquinase-1 (veja Fig. 15-18) e da piruvato desidrogenase (veja Fig. 16-15).

A fosfofrutoquinase-1 é inibida não apenas pelo ATP, mas pelo citrato, o primeiro intermediário do ciclo do ácido cítrico. Quando o ciclo está "ocioso", o citrato acumula-se dentro da mitocôndria e então extravasa para o citoplasma. Quando as concentrações do ATP e do citrato estão elevadas, elas produzem uma inibição alostérica combinada da fosfofrutoquinase-1, que é maior que a soma dos seus efeitos individuais, desacelerando a glicólise.

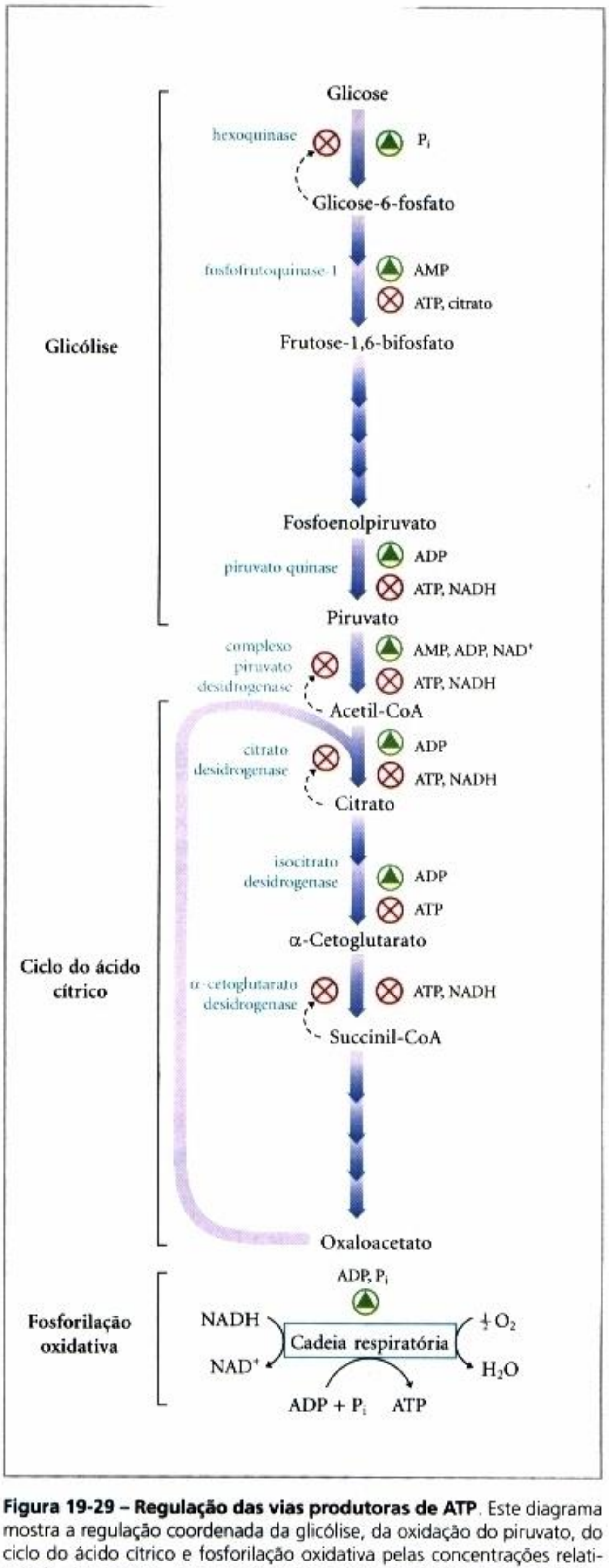

Glicólise
Glicose
hexoquinase
P_i
Glicose-6-fosfato
fosfofrutoquinase-1
AMP
ATP, citrato
Frutose-1,6-bifosfato
Fosfoenolpiruvato
piruvato quinase
ADP
ATP, NADH
Piruvato
complexo piruvato desidrogenase
AMP, ADP, NAD^+
ATP, NADH
Acetil-CoA
Ciclo do ácido cítrico
citrato desidrogenase
ADP
ATP, NADH
Citrato
isocitrato desidrogenase
ADP
ATP
α-Cetoglutarato
α-cetoglutarato desidrogenase
ATP, NADH
Succinil-CoA
Oxaloacetato
Fosforilação oxidativa
ADP, P_i
NADH
NAD^+
Cadeia respiratória
$\frac{1}{2}O_2$
H_2O
ADP + P_i
ATP

Figura 19-29 – Regulação das vias produtoras de ATP. Este diagrama mostra a regulação coordenada da glicólise, da oxidação do piruvato, do ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa pelas concentrações relativas do ATP, ADP e AMP e pelo NADH. Altas [ATP] (ou baixas [ADP] e [AMP]) produzem baixas taxas da glicólise, oxidação do piruvato, oxidação do acetato via ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Todas essas quatro vias são aceleradas quando a utilização do ATP e a formação do ADP, AMP e P_i aumentam. A coordenação da glicólise e do ciclo do ácido cítrico pelo citrato que inibe a glicólise suplementa a ação do sistema da adenina nucleotídeo. Além disso, níveis elevados de NADH e de acetil-CoA também inibem a oxidação do piruvato a acetil-CoA. Quocientes [NADH]/[NAD^+] elevados inibem as reações das desidrogenases do ciclo do ácido cítrico (veja Fig. 16-15).

Mutações nos genes mitocondriais causam doença humana

As mitocôndrias possuem o seu próprio genoma, uma molécula circular de DNA de dupla fita. O cromossomo mitocondrial humano (Fig. 19-30) contém 37 genes (16.569 pares de bases), incluindo 13 que codificam proteínas da cadeia respiratória (Tabela 19-6). Os genes restantes codificam moléculas de RNA ribossômico e de transferência, essenciais para a maquinaria sintetizadora de proteínas da mitocôndria. Muitas das proteínas mitocondriais estão codificadas por genes nucleares, sintetizados nos ribossomos citoplasmáticos e, então, importados pós-translacionalmente e montados dentro da mitocôndria (veja Fig. 27-39).

Tabela 19-6 – Proteínas respiratórias codificadas pelo cromossomo mitocondrial humano

Complexo	Número total de subunidades	Número de subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial
I NADH desidrogenase	> 25	7
II Succinato desidrogenase	4	0
III Ubiquinona:citocromo c oxidorredutase	9	1
IV Citocromo oxidase	13	3
V ATP sintase	12	2

Um crescente número de doenças humanas pode ser atribuído a mutações nos genes mitocondriais. Essas doenças são invariavelmente herdadas da mãe, uma vez que todas as mitocôndrias de um embrião em desenvolvimento são derivadas do óvulo da mãe. Uma doença rara chamada **neuropatia óptica hereditária de Leber** (LHON) afeta o sistema nervoso central, incluindo os nervos ópticos, causando a perda bilateral da visão no início da maioridade. Uma única base alterada no gene mitocondrial *ND4* (Fig. 19-30a) provoca a troca de um resíduo de Arg por um de His na cadeia polipeptídica do complexo I e o resultado é uma mitocôndria parcialmente deficiente na transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona. Embora essas mitocôndrias possam produzir algum ATP por meio da transferência de elétrons do succinato, elas aparentemente não podem suprir ATP suficiente para suportar o metabolismo muito ativo dos neurônios. Como conseqüência, o nervo óptico é lesado, levando à cegueι-

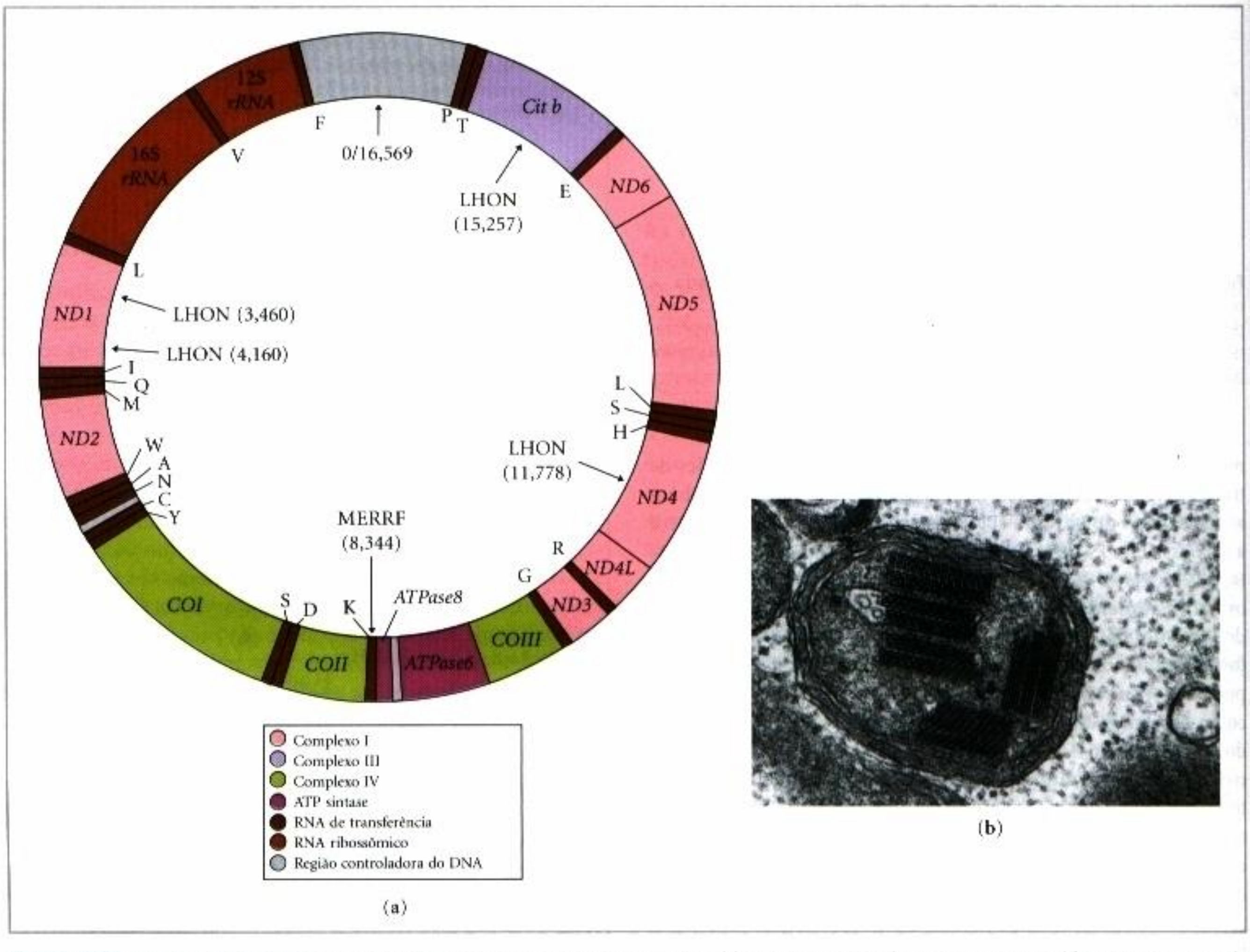


Figura 19-30 – Genes mitocondriais e mutações. (**a**) Mapa do DNA mitocondrial humano, mostrando os genes que codificam as proteínas do complexo I, a NADH desidrogenase (*ND1* a *ND6*); o citocromo *b* do complexo III (*Cit b*); as subunidades da citocromo oxidase (complexo IV) (*COI* a *COIII*) e duas subunidades da ATP sintase (*ATPase 6* e *ATPase 8*). As cores dos genes correspondem àquelas dos complexos mostrados na Figura 19-7. Também estão incluídos os genes para os RNAs ribossômicos (*rRNA*) e para vários RNAs de transferência específicos para mitocôndria. A especificidade dos RNAs de transferência (tRNA) está indicada pelos códigos de uma letra para os aminoácidos. As setas indicam as posições das mutações causadoras da neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) e a epilepsia mioclônica e a doença da fibra vermelha rasgada (MERRF). Os números entre parênteses indicam a posição nos nucleotídeos alterados (o nucleotídeo número 1 está no topo do círculo). (**b**) Micrografia eletrônica de uma mitocôndria anormal do músculo de um indivíduo com MERRF, mostrando as inclusões de proteínas paracristalinas algumas vezes presentes na mitocôndria mutante.

ra. Uma única mudança de base no gene mitocondrial para citocromo *b*, um componente do complexo III, também produz LHON demonstrando que a doença resulta de uma redução geral da função mitocondrial e não especificamente de um defeito no transporte de elétrons através do complexo I.

Epilepsia mioclônica ou doença da fibra vermelha rasgada (MERRF) é causada por uma mutação no gene mitocondrial que codifica um tRNA específico para leucina (leucina-tRNA). Essa doença, caracterizada por um espasmo muscular incontrolável, aparentemente resulta da produção defeituosa de várias proteínas sintetizadas usando os tRNA mitocondriais. As fibras musculares esqueléticas de indivíduos com MERRF possuem mitocôndrias de forma anormal que algumas vezes contêm estruturas paracristalinas (Fig. 19-30b). Mutações no gene de leucina-tRNA mitocondrial são uma das causas do desencadeamento do diabetes melito em adultos. Outras mutações nos genes mitocondriais são consideradas responsáveis pela fraqueza muscular progressiva que caracteriza a miopatia mitocondrial, bem como o crescimento e a deterioração do músculo cardíaco (cardiomiopatia hipertrófica). De acordo com a hipótese das mudanças progressivas que acompanham o envelhecimento, o acúmulo de mutações no DNA mitocondrial, durante uma vida de exposição a agentes que danificam esse DNA, resulta em uma mitocôndria que não pode produzir ATP eficientemente para uma função celular normal.

As mitocôndrias provavelmente surgiram de bactérias endossimbióticas

O fato de a mitocôndria conter o seu próprio DNA, ribossomos e tRNA suporta a teoria da sua origem endossimbiótica (veja Fig. 2-15). Essa teoria supõe que os primeiros organismos capazes de realizar o metabolismo aeróbico, incluindo a produção de ATP ligada à respiração, seriam procariotos. Os eucariotos primitivos que viviam anaerobicamente (por fermentação) adquiriram a habilidade de realizar a fosforilação oxidativa quando estabeleceram uma relação simbiótica com bactérias que viviam no seu citosol. Depois de muita evolução e da movimentação de muitos genes bacterianos para o núcleo do eucarioto "hospedeiro", a bactéria endossimbionte eventualmente se tornou mitocôndria.

Essa teoria pressupõe que os primeiros procariotos de vida livre tinham a maquinaria enzimática para a fosforilação oxidativa. Ela prediz que os seus descendentes procariotos modernos apresentam cadeias respiratórias muito parecidas com as dos eucariotos modernos. De fato, eles apresentam. As bactérias aeróbicas realizam a transferência de elétrons ligados ao NAD dos substratos até o O_2, acoplada à fosforilação do ADP citosólico. As desidrogenases estão localizadas no citosol das bactérias e a cadeia respiratória está na membrana plasmática. Os transportadores de elétrons são semelhantes a alguns carregadores de elétrons da mitocôndria (Fig. 19-31). Eles translocam prótons para fora através da membrana plasmática à medida que os elétrons são transferidos para o O_2. Bactérias como a *Escherichia coli* possuem complexos F_oF_1 na membrana plasmática: a parte F_1 estende-se para o citosol e catalisa a síntese de ATP a partir do ADP e P_i, à medida que os prótons retornam para dentro da célula através do canal de prótons da F_o.

A extrusão de prótons ligada à respiração, por meio da membrana plasmática da bactéria, proporciona a força motriz para outros processos. Certos sistemas de transporte em bactérias realizam a captação de nutrientes extracelulares (lactose, por exemplo) contra um gradiente de concentração, em um co-transporte com os prótons (veja Fig. 12-35). O movimento rotatório dos flagelos das bactérias é dotado de "turbinas de prótons", motores rotatórios moleculares impulsionados não pelo ATP, mas diretamente pelo potencial eletroquímico transmembrana gerado pelo bombeamento de prótons ligados à respiração (Fig. 19-32). É muito provável que o mecanismo quimiosmótico surgiu antes do aparecimento dos eucariotos.

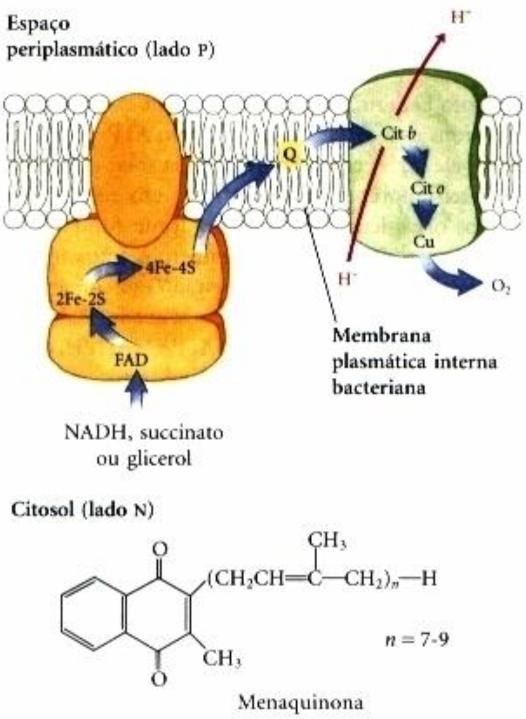

Espaço periplasmático (lado P)
H⁺
Q
Cit b
Cit o
Cu
O₂
H⁺
4Fe-4S
2Fe-2S
FAD
Membrana plasmática interna bacteriana
NADH, succinato ou glicerol
Citosol (lado N)
O
O
CH₃
CH₃
(CH₂CH=C—CH₂)ₙ—H
n = 7-9
Menaquinona

Figura 19-31 – Cadeia respiratória das bactérias. Estão mostrados os carregadores da membrana interna da *E. coli*. A Eubactéria apresenta uma forma mínima do complexo I, contendo todos os grupos prostéticos normalmente associados ao complexo mitocondrial, mas apenas 14 polipeptídeos. Esse complexo da membrana plasmática transporta o NADH para a ubiquinona ou menaquinona, o equivalente da ubiquinona na bactéria, enquanto bombeia prótons para fora, criando assim um potencial eletroquímico que governa a síntese do ATP.

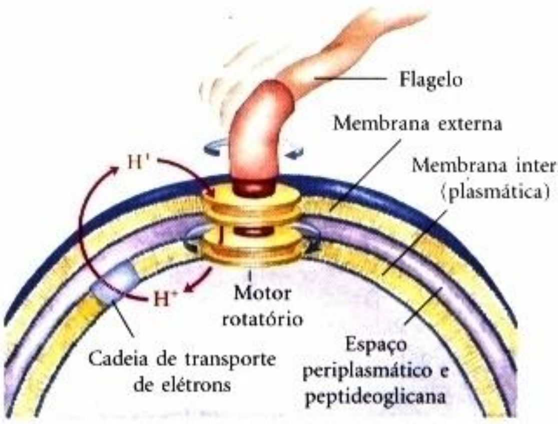

Flagelo
Membrana externa
Membrana interna (plasmática)
H⁺
H⁺
Motor rotatório
Cadeia de transporte de elétrons
Espaço periplasmático e peptideoglicana

Figura 19-32 – Rotação do flagelo da bactéria pela força próton motriz. A haste e os anéis na base do flagelo constituem um motor rotatório que tem sido chamado de "turbina de prótons". Os prótons ejetados pela transferência de elétrons fluem de volta para a célula por meio da "turbina", provocando rotação da haste do flagelo. Esse movimento difere fundamentalmente do movimento do músculo ou do flagelo e cílio dos eucariotos, em que a fonte de energia é a hidrólise do ATP.

FOTOSSÍNTESE: CAPTURA DA ENERGIA LUMINOSA

Passamos agora para uma outra seqüência de reações na qual o fluxo de elétrons está acoplado à síntese do ATP: a fosforilação comandada pela luz. A captação da energia solar pelos organismos fotossintetizadores e a sua conversão em energia química de compostos orgânicos reduzidos é a fonte fundamental de quase toda energia biológica. Os organismos fotossintetizadores e os heterotróficos vivem em um estado estacionário balanceado na biosfera (Fig. 19-33). Os organismos fotossintetizadores captam a energia solar e sintetizam ATP e NADPH, que usam como fonte de energia para sintetizar carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de CO_2 e H_2O. Simultaneamente, eles liberam O_2 na atmosfera. Os heterotróficos aeróbicos (os humanos, por exemplo) usam o O_2 assim formado para degradar os produtos orgânicos energeticamente ricos da fotossíntese até CO_2 e H_2O, gerando ATP para as suas próprias atividades. O CO_2 formado pela respiração nos heterotróficos retorna à atmosfera, para ser usado novamente pelos organismos fotossintetizadores. Dessa forma, a energia solar fornece a força impulsionadora para a reciclagem contínua do CO_2 e O_2 atmosférico por meio da biosfera e fornece os substratos reduzidos (combustíveis), como a glicose, da qual dependem os organismos que não fazem fotossíntese.

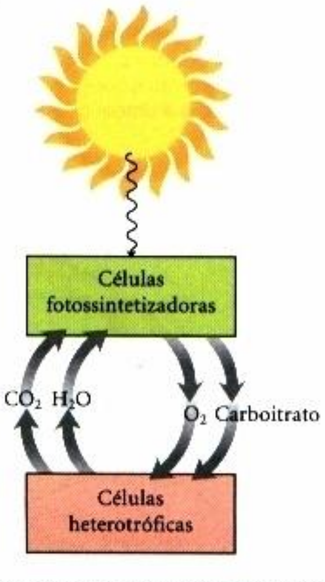


Figura 19-33 – A energia solar é a fonte fundamental de toda energia biológica. Os organismos fotossintetizadores usam a energia do Sol para produzir glicose e outros produtos orgânicos que as células heterotróficas usam como fontes de carbono e energia.

A fotossíntese ocorre em uma grande variedade de bactérias e eucariotos unicelulares (algas), bem como em plantas superiores. Embora nesses organismos o processo difira em detalhes, os mecanismos básicos são extraordinariamente simples e muito do nosso conhecimento acerca da fotossíntese nas plantas superiores é derivado de estudos dos organismos mais simples. A equação geral para a fotossíntese nas plantas superiores descreve uma reação de oxirredução na qual H_2O doa elétrons (como hidrogênio) para a redução do CO_2 até o carboidrato (CH_2O):

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + (CH_2O)$$

Características Gerais da Fotofosforilação

Ao contrário do NADH (o principal doador de hidrogênio na fosforilação oxidativa), a H_2O é um doador de elétrons pobre. Seu potencial de redução padrão é de +0,82V, comparado com –0,32V para o NADH. A fotofosforilação difere da fosforilação oxidativa por requerer energia na forma de luz para *criar* um bom doador de elétrons. Na fotofosforilação, os elétrons fluem por meio de uma série de transportadores ligados à membrana, incluindo citocromos, quinonas e proteínas ferro-enxofre, enquanto prótons são bombeados através de uma membrana para criar um potencial eletroquímico. A transferência dos elétrons e o bombeamento dos prótons são catalisados por complexos de membrana homólogos, em estrutura e função, ao complexo III da mitocôndria. O potencial eletroquímico que eles produzem é a força motriz para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i pelo complexo da ATP sintase associado à membrana, muito semelhante àquele da fosforilação oxidativa.

Nas plantas superiores, a fotossíntese abrange dois processos: as **reações dependentes da luz** ou **reações luminosas**, que ocorrem apenas quando as plantas são iluminadas, e as **reações de assimilação** ou **de fixação do carbono**, algumas vezes erroneamente chamadas de reações escuras, que são governadas por produtos das reações luminosas (Fig. 19-34). Nas reações luminosas, a clorofila e outros pigmentos das células fotossintetizadoras absorvem a energia luminosa e a conservam na forma de ATP e NADPH. Simultaneamente, o O_2 é produzido. Nas reações de fixação do carbono, o ATP e o NADPH são usados para reduzir o CO_2 para formar trioses fosfatos, amido, sacarose e outros produtos deles derivados. Neste capítulo estamos preocupados apenas com as reações luminosas que levam à síntese de ATP e NADPH. A redução do CO_2 é descrita no Capítulo 20, juntamente com outras vias de síntese de carboidratos.

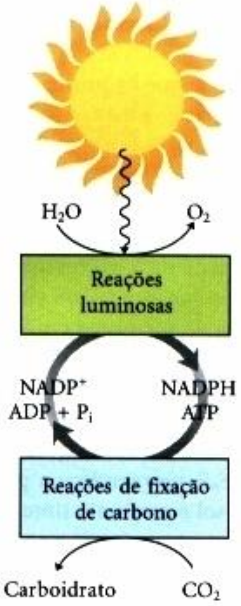


Figura 19-34 – As reações luminosas geram NADPH e ATP, ricos de energia, à custa da energia solar. Esses produtos são usados nas reações fixadoras de carbono, que ocorrem na luz ou na escuridão, para reduzir o CO_2 e formar trioses e compostos mais complexos (como a glicose) derivados das trioses.

Nas plantas, a fotossíntese ocorre nos cloroplastos

Nas células eucarióticas fotossintetizadoras, tanto as reações de fixação do carbono quanto as luminosas ocorrem nos cloroplastos (Fig. 19-35), organelas intracelulares associadas à membrana e geralmente de alguns mícrons de diâmetro (veja Fig. 2-7b e pág. 23). Similarmente às mitocôndrias, os cloroplastos são envolvidos por duas membranas, uma externa, que é permeável a pequenas moléculas e íons, e uma interna, que encerra o compartimento interno. Esse compartimento contém muitas vesículas ou sacos achatados e envoltos por membranas, denominados de **tilacóides**, usualmente arranjados em pilhas chamadas **grana** (Fig. 19-35b). Embebidos nas membranas dos tilacóides estão os pigmentos fotossintetizadores e os complexos enzimáticos que promovem as reações luminosas e a síntese do ATP. O **estroma** (fase aquosa encerrada pela membrana interna) contém a maioria das enzimas requeridas para as reações de assimilação do carbono.

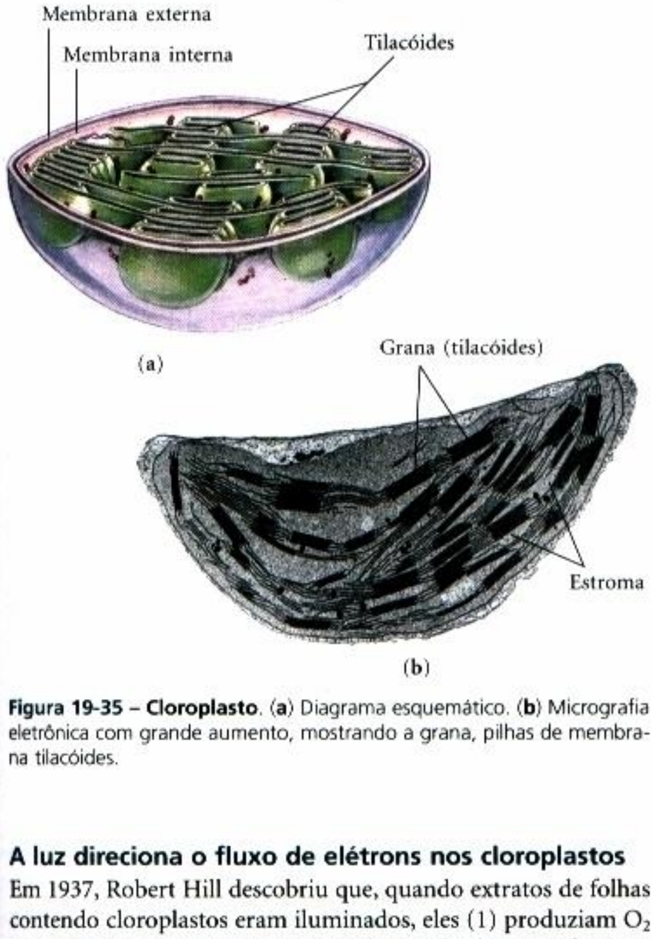


Figura 19-35 – Cloroplasto. (**a**) Diagrama esquemático. (**b**) Micrografia eletrônica com grande aumento, mostrando a grana, pilhas de membrana tilacóides.

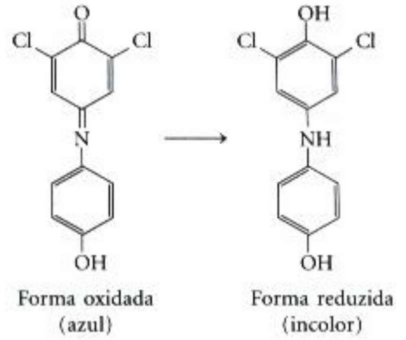
A luz direciona o fluxo de elétrons nos cloroplastos

Em 1937, Robert Hill descobriu que, quando extratos de folhas contendo cloroplastos eram iluminados, eles (1) produziam O_2 e (2) reduziam um aceptor não-biológico de elétrons adicionado ao meio, de acordo com a **reação de Hill**:

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} 2AH_2 + O_2$$

onde A é o aceptor artificial de hidrogênio ou **reagente de Hill**. Um dos reagentes de Hill, o corante 2,6-diclorofenolindofenol, é azul quando oxidado (A) e incolor quando reduzido (AH_2). Quando o extrato de folha, suplementado com o corante, foi iluminado, o corante azul tornou-se incolor e o O_2 foi produzido. No escuro, não ocorreu nem a produção de O_2 nem a redução do corante. Essa foi a primeira evidência de que a energia luminosa absorvida provoca um fluxo de elétrons da H_2O para um aceptor de elétrons. Além disso, Hill observou que o CO_2 não era requerido nem reduzido a uma forma estável nessas condições. A produção do O_2 pode ser dissociada da redução do CO_2. Vários anos depois, Severo Ochoa mostrou que o $NADP^+$ é o receptor biológico de elétrons nos cloroplastos, de acordo com a equação:

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} 2NADPH + 2H^+ + O_2$$



Diclorofenolindofenol

Para compreendermos esse processo fotoquímico, devemos inicialmente considerar os efeitos da absorção luminosa na estrutura molecular.

Absorção da Luz

A luz visível é uma radiação eletromagnética de comprimentos de onda de 400 até 700nm, uma pequena parte do espectro eletromagnético (Fig. 19-36), indo do violeta até o vermelho. A energia de um único **fóton** (um quantum de luz) é maior na extremidade violeta do espectro que na extremidade vermelha; comprimentos de onda menores (e freqüências elevadas) correspondem a energias maiores. A energia de um "mol" de fótons (um einstein; 6×10^{23} fótons) de luz visível é da ordem de 170 a 300kJ, quase uma ordem de grandeza maior que os 30 a 50kJ requeridos para sintetizar um mol de ATP a partir do ADP e P_i.

Quando um fóton é absorvido, um elétron da molécula que o absorveu (cromóforo) é deslocado para um nível superior de energia. Isso é um evento tudo-ou-nada; para ser absorvido, o fóton deve conter uma quantidade de energia (um **quantum**) que iguale exatamente a energia da transição eletrônica. Uma molécula que absorveu um fóton está em um **estado excitado**, que é geralmente instável. Um elétron deslocado para um orbital superior de energia usualmente retorna rapidamente ao seu orbital de menor energia; a molécula excitada decai para o estável **estado fundamental**, fornecendo o quantum absorvido como luz ou calor ou usando-o para realizar um trabalho químico. A emissão de luz que acompanha o decaimento das moléculas excitadas (chamada **fluorescência**) é sempre de um comprimento de onda maior (energia menor) que o da luz absorvida. Um modo alternativo de decaimento, importante na fotossíntese, envolve a transferência direta da energia de excitação de uma molécula excitada para uma molécula vizinha.

A clorofila absorve energia luminosa para a fotossíntese

Os mais importantes pigmentos que absorvem luz nas membranas tilacóides são as **clorofilas**, pigmentos verdes com estruturas policíclicas planas, que se assemelham à protoporfirina da hemoglobina (veja Fig. 7-1), exceto que o Mg^{2+}, e não o Fe^{2+}, ocupa a posição central (Fig. 19-37). Todas as clorofilas apre-

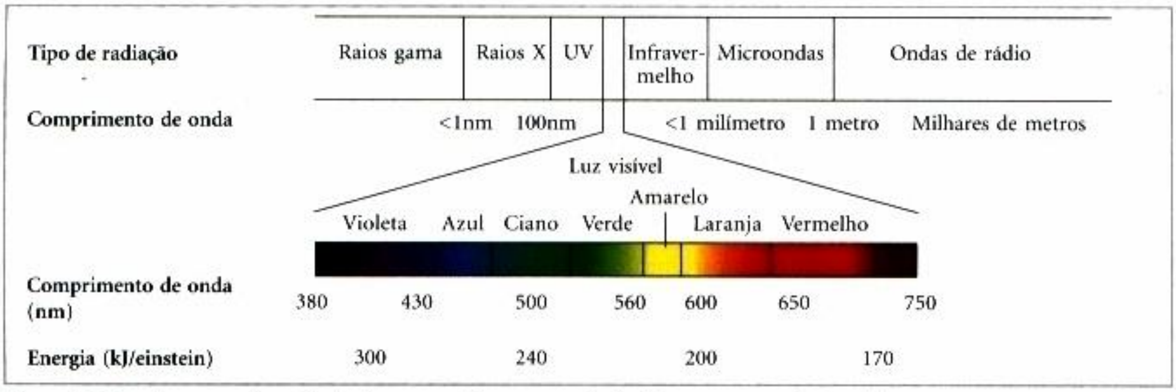

Tipo de radiação
Raios gama
Raios X
UV
Infravermelho
Microondas
Ondas de rádio
Comprimento de onda
<1nm
100nm
<1 milímetro
1 metro
Milhares de metros
Luz visível
Amarelo
Violeta
Azul
Ciano
Verde
Laranja
Vermelho
Comprimento de onda (nm)
380
430
500
560
600
650
750
Energia (kJ/einstein)
300
240
200
170

Figura 19-36 – O espectro da radiação eletromagnética e a energia dos fótons no intervalo visível do espectro. Um einstein equivale a 6 × 10^{23} fótons.

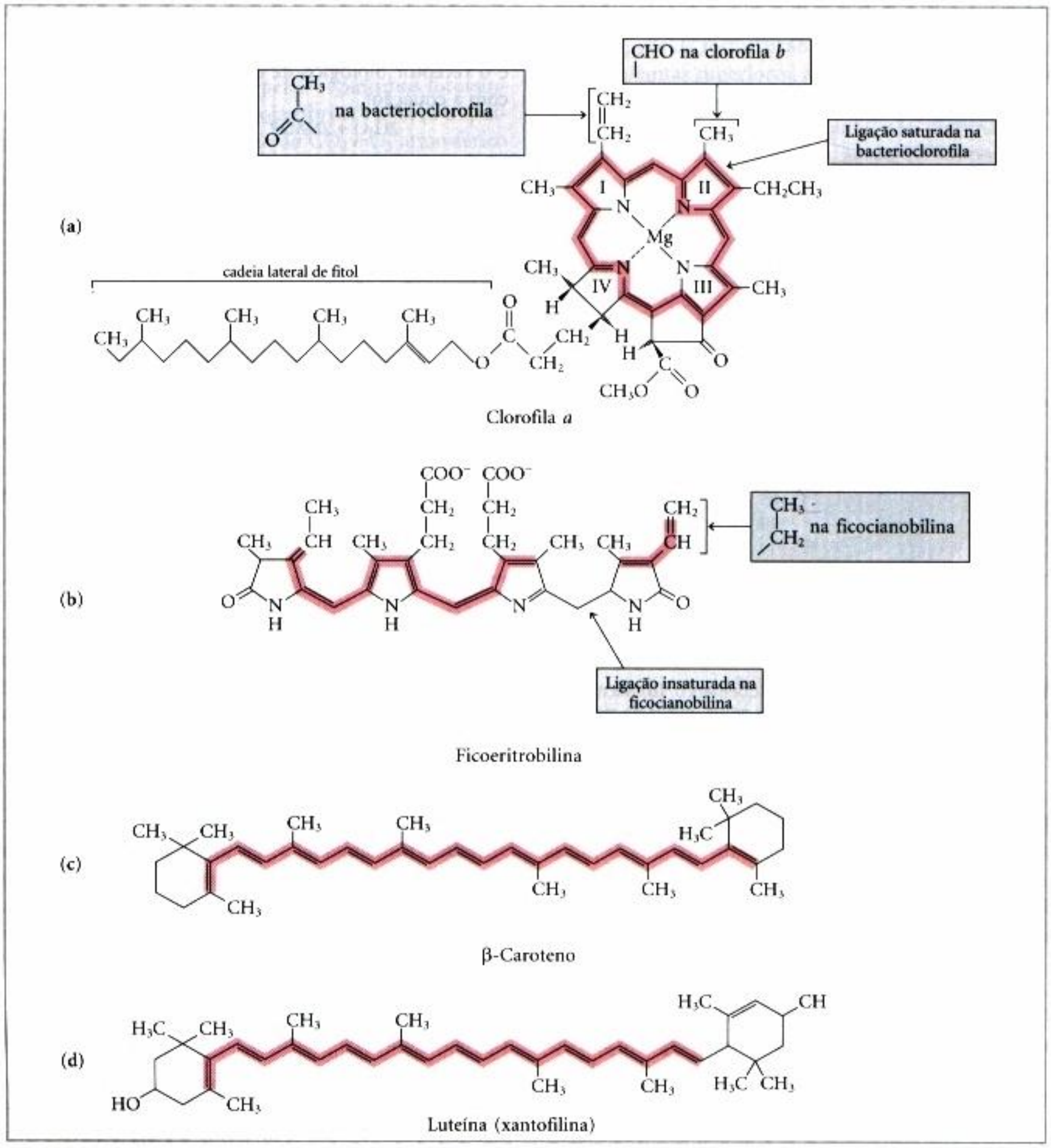

CHO na clorofila b
CH₃ C O na bacterioclorofila
Ligação saturada na bacterioclorofila
(a)
cadeia lateral de fitol
I
II
III
IV
Mg
Clorofila a
(b)
na ficocianobilina
Ligação insaturada na ficocianobilina
Ficoeritrobilina
(c)
β-Caroteno
(d)
Luteína (xantofilina)

Figura 19-37 – Fotopigmentos primários e secundários. (**a**) As clorofilas *a* e *b* e a bacterioclorofila são os coletores primários da energia luminosa. (**b**) A ficoeritrobilina e a ficocianobilina (ficobilinas) são os pigmentos antena na cianobactéria e nas algas vermelhas. (**c**) O β-caroteno (um carotenóide) e (**d**) a luteína (também chamada xantofila) são pigmentos acessórios nas plantas. As áreas que apresentam um sombreamento róseo são os sistemas conjugados (alternância de simples e duplas ligações) que fundamentalmente são responsáveis pela absorção da luz visível.

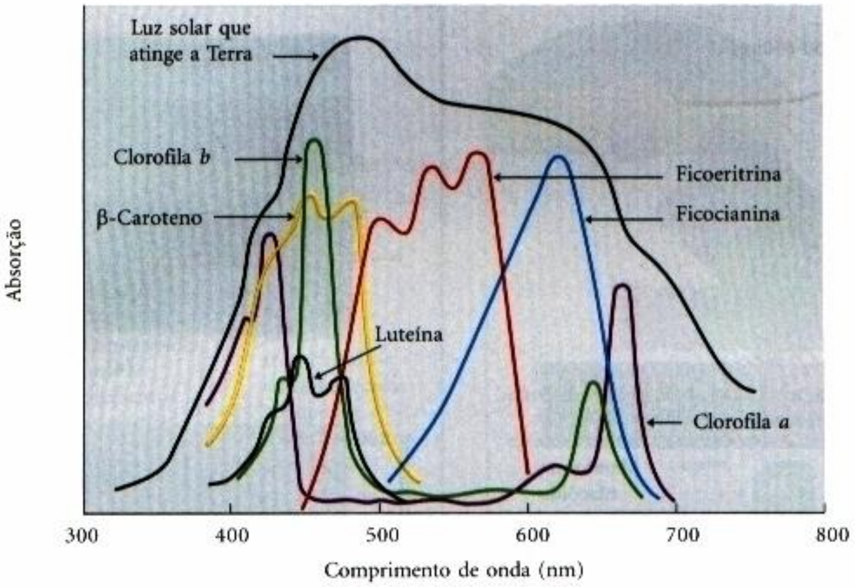


Figura 19-38 – Absorção da luz visível pelos fotopigmentos. As plantas são verdes porque os seus pigmentos absorvem luz das regiões vermelha e azul do espectro, deixando fundamentalmente que a luz verde seja refletida ou transmitida. Compare os espectros de absorção dos pigmentos com o espectro da luz solar que atinge a superfície da Terra. A combinação das clorofilas (*a* e *b*) e dos pigmentos acessórios capacita as plantas a captarem a maior parte da energia disponível da luz solar.

As quantidades relativas de clorofila e pigmentos acessórios são características para as diferentes espécies de plantas. A variação na proporção desses pigmentos é responsável pela diversidade das cores dos organismos fotossintetizadores, desde o azul-esverdeado-escuro das agulhas dos abetos até o verde-esverdeado das folhas da acerácea ou então até cores vermelha, marrom ou púrpura de algumas espécies de algas multicelulares e certas folhas de plantas decorativas.

sentam uma longa cadeia lateral **fitol**, esterificada com um grupo carboxílico substituinte no anel IV. Os quatro átomos de nitrogênio da clorofila, orientados para dentro, são coordenados com o Mg^{2+}.

O sistema heterocíclico de anéis de cinco átomos que envolve o Mg^{2+} apresenta um prolongamento com estrutura poliênica, com alternância de ligações simples e duplas. Esses polienos apresentam caracteristicamente uma forte absorção na região visível do espectro (Fig. 19-38). Usualmente os cloroplastos apresentam coeficientes de extinção molar altos (veja Adendo 5-1) e por isso são muito apropriados para absorver a luz visível durante a fotossíntese.

Os cloroplastos das plantas superiores contêm tanto a clorofila *a* como a *b* (Fig. 19-37a). Embora ambas sejam verdes, os seus espectros de absorção são suficientemente diferentes (Fig. 19-38), permitindo que elas complementem o intervalo de absorção da luz na região do visível. A maioria das plantas superiores contém duas vezes mais clorofila *a* que clorofila *b*. Os pigmentos nas algas e bactérias fotossintetizadoras incluem clorofilas que diferem apenas ligeiramente dos pigmentos das plantas.

A clorofila geralmente está associada a proteínas específicas, formando os **complexos coletores de luz** (CCL), nos quais as moléculas de clorofila estão fixas umas em relação às outras, a outros complexos protéicos e à membrana. A estrutura detalhada de um complexo coletor de luz foi determinada a partir de cristalografia de raios X (Fig. 19-39). Ela contém sete moléculas da clorofila *a*, cinco da clorofila *b* e duas do pigmento acessório luteína (veja a seguir).

As cianobactérias e as algas vermelhas utilizam as **ficobilinas**, tal como a ficoeritrobilina e a ficocianobilina (Fig. 19-37b), como pigmentos coletores de luz. Esses tetrapirróis lineares apresentam o prolongamento poliênico encontrado nas clorofilas, mas não a estrutura cíclica nem o Mg^{2+} central. As ficobilinas estão ligadas covalentemente a proteínas específicas, formando as **ficobiliproteínas**, que se associam em complexos altamente ordenados chamados ficobilissomos (Fig. 19-40), os quais constituem as estruturas coletoras primárias de energia nesses microrganismos.

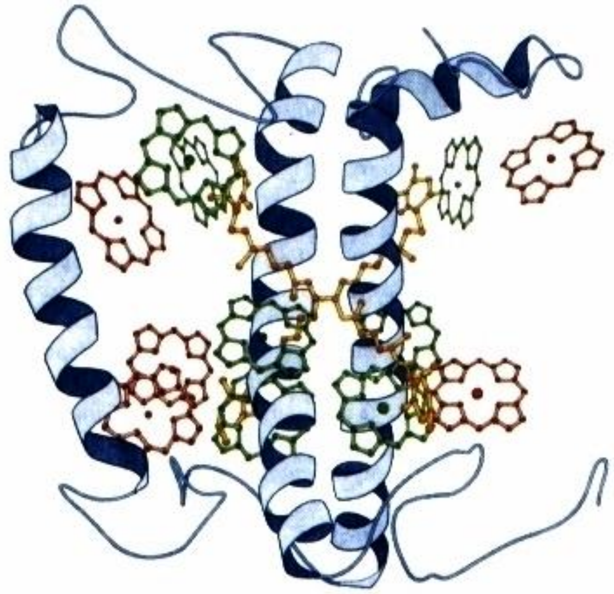


Figura 19-39 – Um complexo coletor de luz, CCLII. A unidade funcional é um CCL trímero contendo 36 moléculas de clorofila e seis de luteína. A figura mostra um monômero visto no plano da membrana. Existem três segmentos em α-hélice transmembrana, sete moléculas de clorofila *a* (verde), cinco moléculas de clorofila *b* (vermelho) e duas moléculas do pigmento acessório luteína (amarelo) que formam um braço cruzado interno.

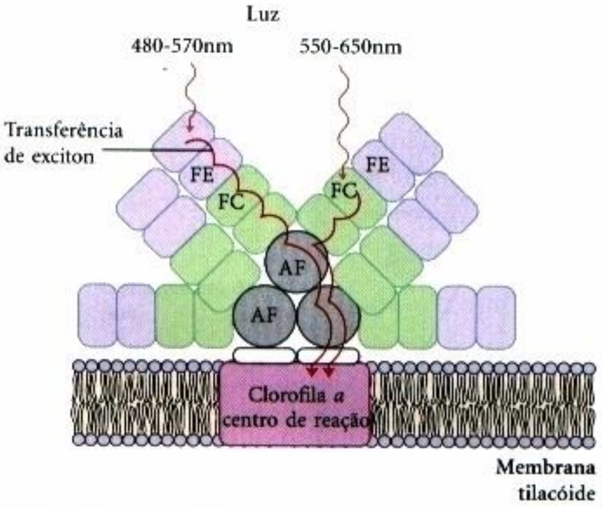


Figura 19-40 – Um ficobilissomo. Nestas montagens altamente estruturadas, encontradas nas cianobactérias e algas vermelhas, os pigmentos ficobilinas ligados a proteínas específicas formam complexos denominados ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) e aloficocianina (AF). A energia dos fótons absorvidos pela FE e FC é transmitida por meio da AF (proteína ligadora de ficocianobilina) para a clorofila *a* do centro de reação por meio de um processo chamado transferência de exciton, que será discutido na página seguinte.

Os pigmentos acessórios ampliam o intervalo de absorção da luz

Além das clorofilas, as membranas tilacóides contêm pigmentos secundários que absorvem luz (**pigmentos acessórios**), os carotenóides. Os **carotenóides** podem ser amarelos, vermelhos ou púrpuros. Os mais importantes são o **β-caroteno** (Fig. 19-37c), um composto isoprenóide vermelho-alaranjado, e o carotenóide amarelo **luteína** (Fig. 19-37d). Os pigmentos carotenóides absorvem luz em comprimentos de onda não absorvidos pelas clorofilas (Fig. 19-38) e, desse modo, são receptores suplementares de luz.

A determinação experimental da eficácia da luz de diferentes cores em promover a fotossíntese produz um **espectro de ação** (Fig. 19-41), geralmente útil na identificação do pigmento primariamente responsável por um efeito biológico da luz. Ao captar a luz em uma região do espectro não utilizada por outros organismos, o fotossintetizador pode reivindicar um nicho ecológico ímpar. Por exemplo, as ficobilinas das algas vermelhas e cianobactérias absorvem na região de 520 a 630nm (Fig. 19-38), permitindo que esses organismos ocupem nichos em que a luz de maiores e menores comprimentos de onda foi filtrada pelos pigmentos de outros organismos que vivem na água acima deles ou então pela própria água.

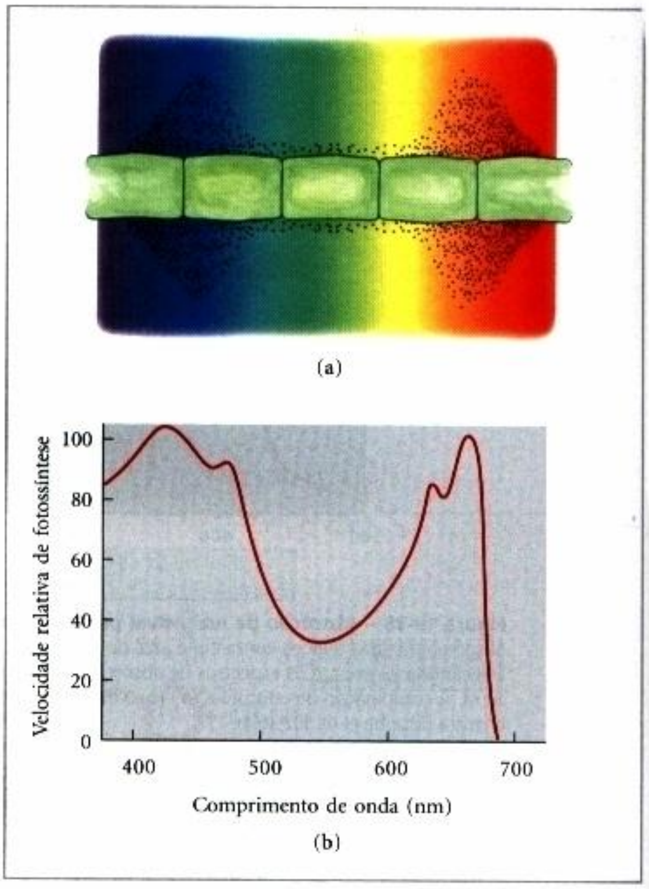


Figura 19-41 – Duas maneiras de se determinar o espectro de ação na fotossíntese. (**a**) Os resultados de um experimento clássico feito por T.W. Englemann, em 1882, para determinar qual comprimento de onda da luz era mais eficaz para a fotossíntese. Englemann colocou uma alga filamentosa fotossintetizadora em um microscópio e a iluminou com a luz de um prisma, de forma que as células em uma parte do filamento receberam principalmente luz azul, uma outra parte, amarela, e uma outra, vermelha. Para determinar quais células realizavam a fotossíntese mais ativamente, também foram colocadas na lâmina do microscópio bactérias que migram para regiões com maior concentração de O_2. Após um período de iluminação, a distribuição das bactérias mostrou que os maiores níveis de O_2 (produzidos pela fotossíntese) estavam nas regiões iluminadas com luz violeta e vermelha. (**b**) Um experimento semelhante, usando técnicas modernas (um elétrodo seletivo de oxigênio) para medir a produção de O_2, deu o mesmo resultado. Um espectro de ação descreve a velocidade relativa de fotossíntese para a iluminação com um número constante de fótons de diferentes comprimentos de onda. O espectro de ação é útil uma vez que, pela comparação com o espectro de absorção (como aqueles na Fig. 19-38), sugere quais são os pigmentos capazes de canalizar a energia para a fotossíntese.

A clorofila canaliza a luz absorvida para os centros de reação por meio da transferência de excitons

Os pigmentos que absorvem a luz das membranas tilacóides ou das bactérias estão arranjados em conjuntos funcionais chamados **fotossistemas.** Nos cloroplastos do espinafre, por exemplo, cada fotossistema contém cerca de 200 moléculas de clorofilas e cerca de 50 moléculas de carotenóides. Todas as moléculas dos pigmentos em um fotossistema podem absorver fótons, mas apenas algumas poucas moléculas de clorofila associadas ao **centro de reação fotoquímico** são especializadas para transformar a luz em energia química. As moléculas dos outros pigmentos em um fotossistema são chamadas de **moléculas coletoras de luz** ou **moléculas antena.** Elas absorvem a energia luminosa e a transmitem rápida e eficientemente para o centro de reação (Fig. 19-42).

As moléculas de clorofila nos complexos coletores de energia apresentam propriedades de absorção de luz que são ligeiramente diferentes daquelas da clorofila livre. Quando as moléculas de clorofila isoladas são excitadas pela luz, *in vitro*, a energia absorvida é rapidamente liberada como fluorescência e calor. Entretanto, quando a clorofila nas folhas intactas é excitada pela luz visível (Fig. 19-43, passo ①), uma pequena fluorescência é observada e a molécula de clorofila antena excitada transfere a energia diretamente para uma molécula de clorofila vizinha, que se torna excitada enquanto a primeira molécula retorna ao seu estado fundamental (passo ②). Essa transferência de energia, também chamada **transferência de exciton**, estende-se para uma terceira, quarta ou subseqüente molécula vizinha, até que um par especial de moléculas de clorofila *a* no

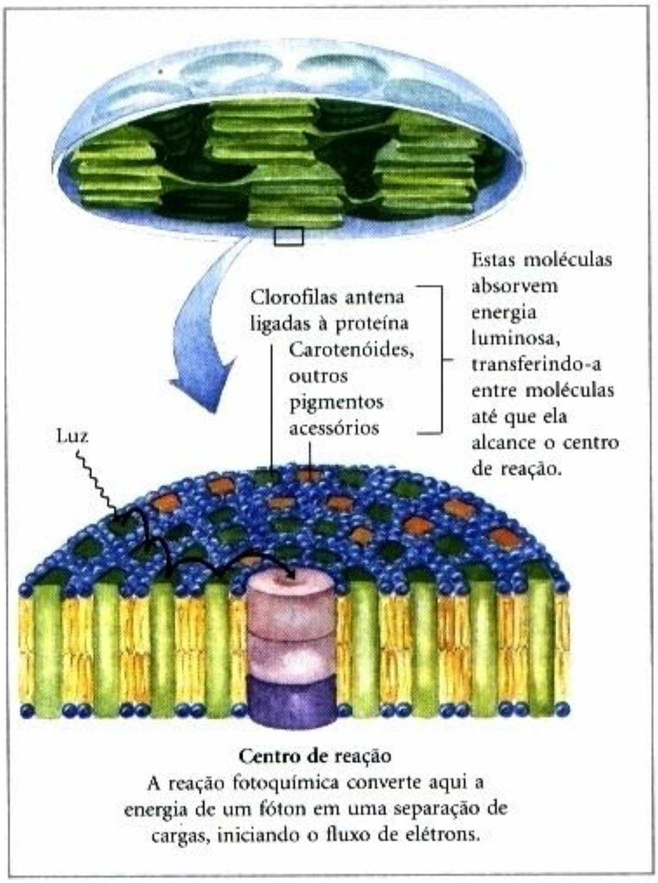
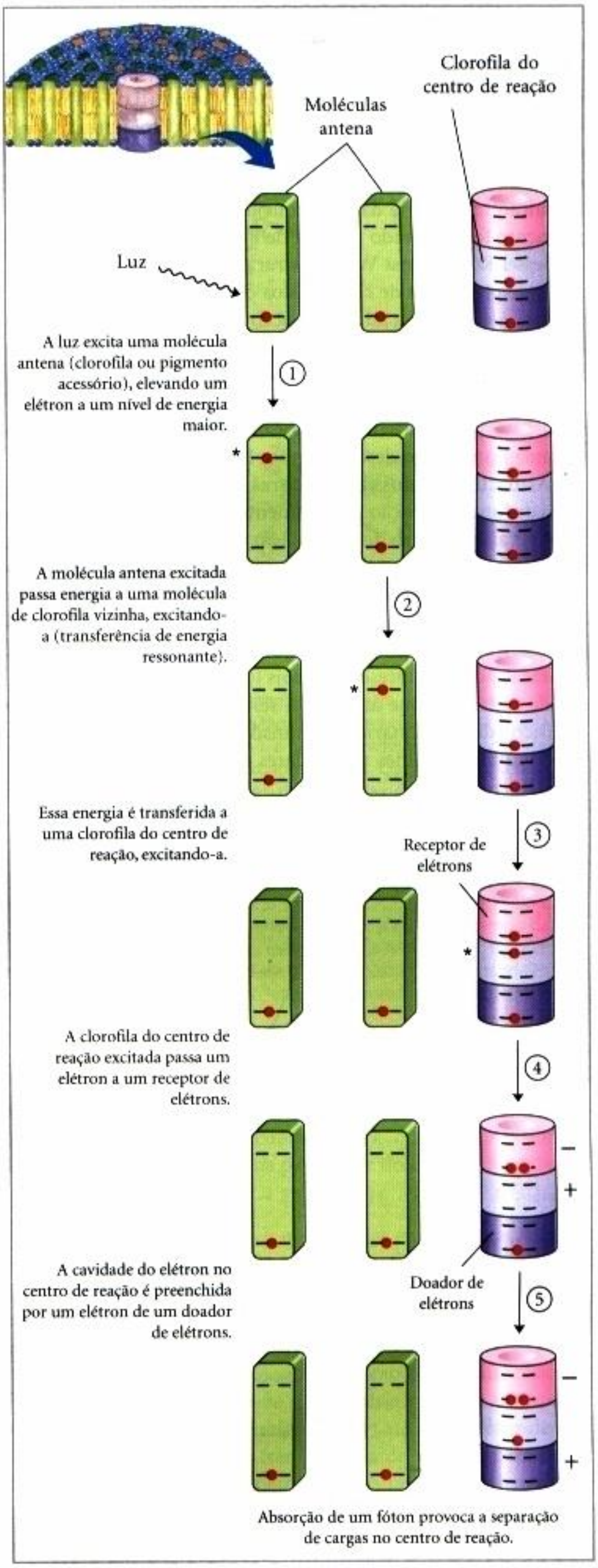

Clorofilas antena ligadas à proteína
Carotenóides, outros pigmentos acessórios
Estas moléculas absorvem energia luminosa, transferindo-a entre moléculas até que ela alcance o centro de reação.
Luz
Centro de reação
A reação fotoquímica converte aqui a energia de um fóton em uma separação de cargas, iniciando o fluxo de elétrons.

Figura 19-42 – Organização dos fotossistemas nas membranas tilacóides. Os fotossistemas são empacotados compactamente na membrana tilacóide, com várias centenas de clorofilas antena e pigmentos acessórios rodeando um centro de fotorreação. A absorção de um fóton por qualquer clorofila antena provoca a excitação do centro de reação por meio da transferência de excitons (setas pretas). Também estão embebidos na membrana tilacóide o complexo do citocromo b_6f e a ATP sintase (veja Fig. 19-47).

centro de reação fotoquímico seja excitado (passo ③). Nessa molécula de clorofila excitada, um elétron é promovido para um orbital de energia superior. Esse elétron então passa para um receptor de elétrons vizinho, que é parte da cadeia de transferência de elétrons, deixando o centro de reação da clorofila com um orbital vazio (uma "cela do elétron") (passo ④). O aceptor de elétrons adquire uma carga negativa nessa transação. O elétron perdido pelo centro de reação da clorofila é substituído por um elétron de uma molécula doadora de elétrons vizinha (passo ⑤), que se torna positivamente carregada. Dessa forma, *a excitação pela luz provoca separação de carga elétrica e inicia uma cadeia de oxirredução.*

O Evento Fotoquímico Central: O Fluxo de Elétrons Impulsionado pela Luz

A transferência de elétrons impulsionada pela luz nos cloroplastos das plantas é realizada por sistemas multienzimáticos na membrana tilacóide. A atual concepção dos mecanismos fotossintetizadores é uma composição baseada em estudos de cloroplastos de plantas e de uma variedade de bactérias e algas. A determinação das estruturas moleculares dos complexos fotossintetizadores das bactérias (por cristalografia de raios X) tem proporcionado uma melhoria do conhecimento dos eventos moleculares da fotossíntese.


Moléculas antena
Clorofila do centro de reação
Luz
①
*
②
*
Receptor de elétrons
③
*
④
−
+
Doador de elétrons
⑤
−
+

A luz excita uma molécula antena (clorofila ou pigmento acessório), elevando um elétron a um nível de energia maior.

A molécula antena excitada passa energia a uma molécula de clorofila vizinha, excitando-a (transferência de energia ressonante).

Essa energia é transferida a uma clorofila do centro de reação, excitando-a.

A clorofila do centro de reação excitada passa um elétron a um receptor de elétrons.

A cavidade do elétron no centro de reação é preenchida por um elétron de um doador de elétrons.

Absorção de um fóton provoca a separação de cargas no centro de reação.

Figura 19-43 – A transferência de exciton. Este esquema generalizado mostra a conversão da energia de um fóton absorvido na separação das cargas no centro de reação. Os passos são descritos com mais detalhes no texto. Observe que o passo ① pode ser repetido várias vezes entre sucessivas moléculas antena, até que um centro de reação da clorofila seja alcançado. O asterisco (*) representa o estado de excitação de uma molécula antena.

As bactérias apresentam um de dois tipos de centros de reação fotoquímicos simples

Uma observação importante apareceu em 1952 a partir dos estudos de bactérias fotossintetizadoras, quando Louis Duysens observou que a iluminação das membranas fotossintetizadoras da bactéria púrpura *Rhodospirillum rubrum* com pulsos de luz de comprimento de onda específico (870nm) causou uma diminuição temporária da luz naquele comprimento de onda; o pigmento foi descorado pela luz de 870nm. Estudos posteriores de Bessel Kok e Horst Witt mostraram um branqueamento similar de pigmentos de cloroplastos de plantas por luz de 680 e 700nm. Além disso, a adição do aceptor (não-biológico) de elétrons $[Fe(CN)_6]^{3-}$ causou o descoramento nesses comprimentos de onda *sem iluminação*. O descoramento dos pigmentos foi devido à perda de um elétron de um **centro de reação fotoquímico**. Esses pigmentos foram nomeados a partir do comprimento de onda do máximo descoramento: P870, P680 e P700.

As bactérias fotossintetizadoras apresentam uma maquinaria de fototransdução relativamente simples, com um ou dois tipos gerais de centro de reação. Um deles (encontrado na bactéria púrpura) passa os elétrons para uma quinona por meio da **feofitina** (clorofila sem o íon Mg^{2+} central). O outro (nas bactérias sulfurosas verdes) passa os elétrons para um sistema ferro-enxofre por meio de uma quinona. As cianobactérias e as plantas superiores apresentam dois fotossistemas (FSII e FSIII), um de cada tipo, que atuam em série. Estudos bioquímicos e biofísicos da maquinaria fototransdutora da bactéria têm revelado muitos detalhes moleculares dos centros de reação. Esses sistemas das bactérias servem, contudo, como protótipos para os sistemas de fototransdução mais complexos das plantas superiores.

O centro de reação feofitina-quinona (centro de reação tipo II). A maquinaria fotossintetizadora na bactéria púrpura consiste de três módulos básicos (Fig. 19-44a): um único centro de reação (P870), um complexo de transferência de elétrons, citocromo bc_1, similar ao complexo III da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e uma ATP sintase, também similar à da mitocôndria. A iluminação impulsiona os elétrons por meio da feofitina e quinona para o complexo do citocromo bc_1. Após passar pelo complexo, os elétrons fluem por meio do citocromo c_2 de volta para o centro de reação, restabelecendo seu estado de pré-iluminação. Esse fluxo cíclico de elétrons impulsionados pela luz propicia a energia para o bombeamento de prótons pelo complexo do citocromo bc_1. Com a energia resultante do gradiente de prótons, o módulo ATP sintase produz ATP exatamente como na mitocôndria.

As estruturas tridimensionais dos centros de reação da bactéria púrpura (*Rhodopseudomonas viridis* e *Rhodobacter sphaeroides*), deduzidas a partir de cristalografia de raios X, elucidam como a fototransdução ocorre no centro de reação feofitina-quinona. O centro de reação da *R. viridis* (Fig. 19-45a) é um grande complexo protéico contendo quatro subunidades polipeptídicas e 13 co-fatores: dois pares de clorofilas da bactéria, um par de feofitina, duas quinonas, um ferro não-heme e quatro hemes no citocromo tipo *c* associado.

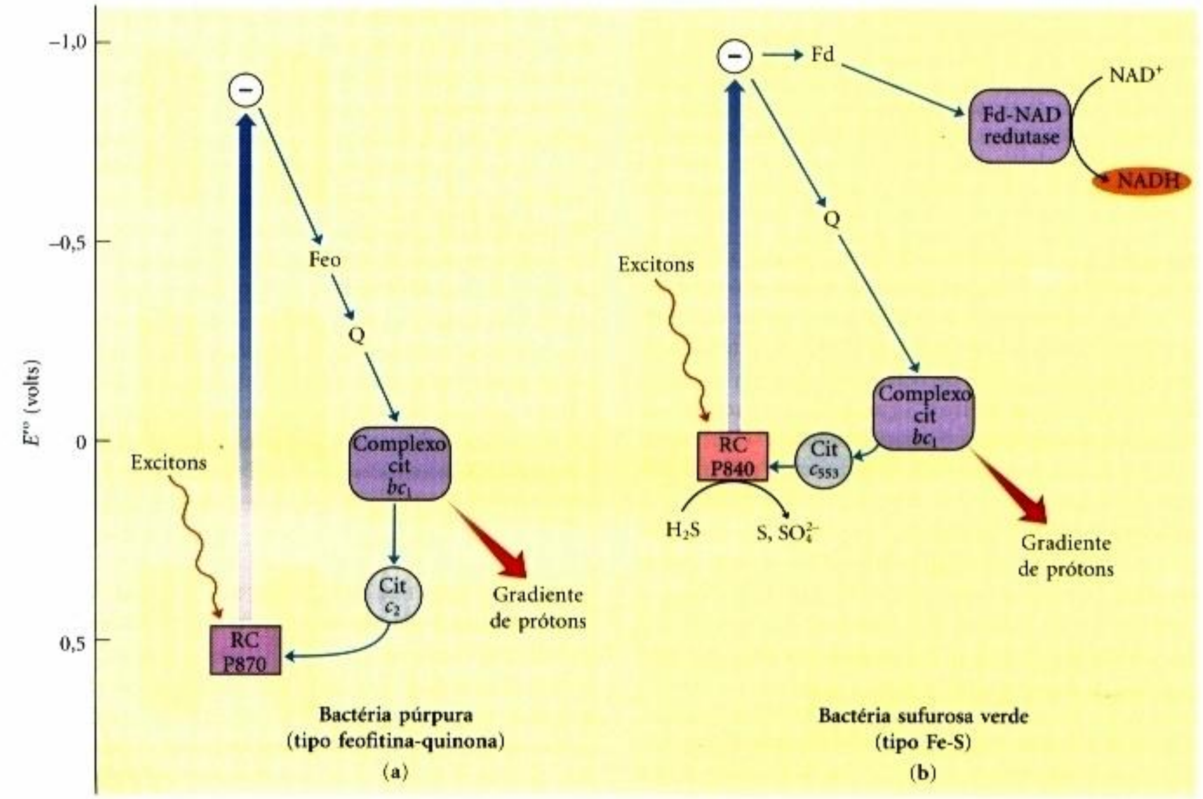


Figura 19-44 – Módulos funcionais da maquinaria fotossintetizadora nas bactérias púrpura e sulfurosa verde. (**a**) Na bactéria púrpura, a energia luminosa impulsiona os elétrons do centro de reação P870 por meio da feofitina (Feo), uma quinona (Q) e o complexo do citocromo bc_1 e, então, por meio do citocromo c_2, de volta para o centro de reação. O fluxo de elétrons por meio do complexo do citocromo bc_1 provoca o bombeamento de prótons, criando um potencial eletroquímico que promove a síntese de ATP. (**b**) A bactéria sulfurosa verde apresenta duas vias para os elétrons impulsionados pela excitação do P840. Uma via cíclica passa por uma quinona para o complexo do citocromo bc_1 e, de volta para o centro de reação, por meio do citocromo *c*. Uma via não-cíclica passa do centro de reação, pela ferredoxina (Fd), uma proteína do tipo ferro-enxofre, e então para o NAD⁺ em uma reação catalisada pela NAD-ferredoxina redutase.

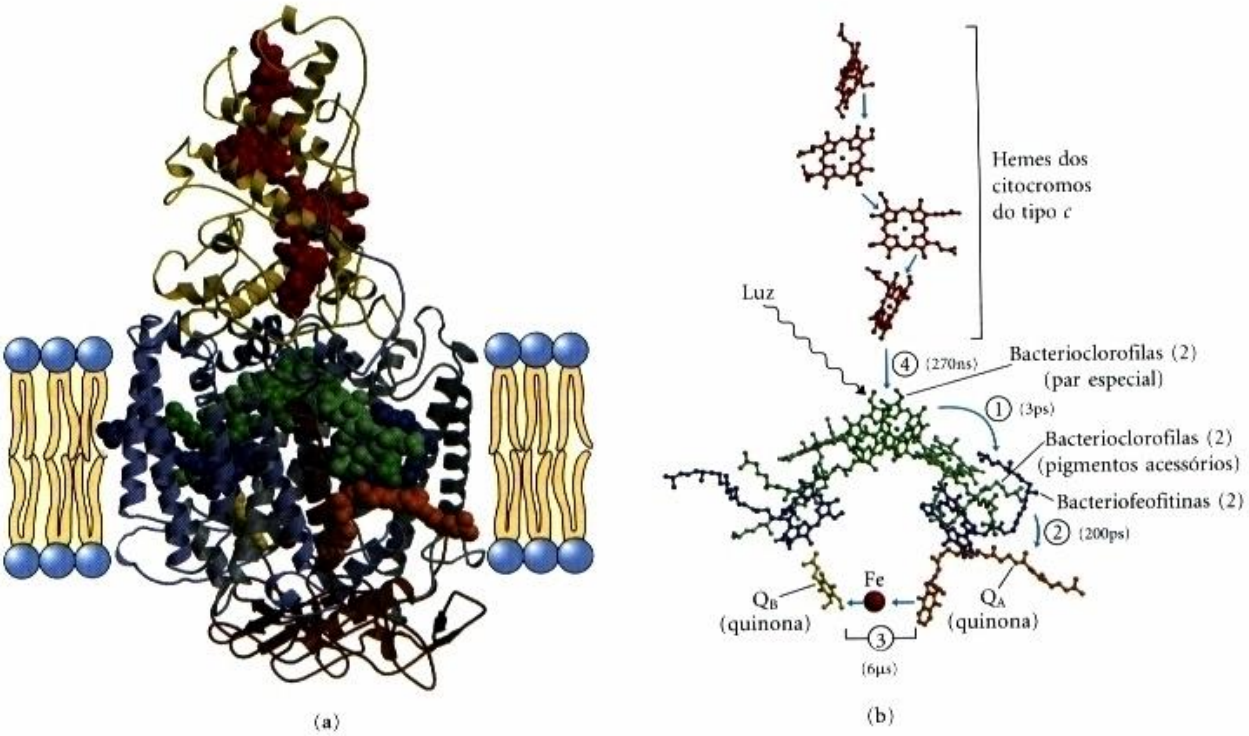


Figura 19-45 – Centro de fotorreação da bactéria púrpura *Rhodopseudomonas viridis*. (**a**) O sistema tem quatro componentes: três subunidades H, M e L (marrom, azul e cinza, respectivamente), com um total de 11 segmentos de hélice transmembrana, e uma quarta proteína, o citocromo c (amarelo), associado ao complexo na superfície da membrana. As subunidades L e M são proteínas transmembrana emparelhadas que juntas formam uma estrutura cilíndrica com uma simetria bilateral ao redor do seu eixo longitudinal. Os grupos prostéticos que participam dos eventos fotoquímicos são mostrados como estruturas bolas-e-bastões. Dois pares de moléculas de bacterioclorofila (verde) estão ligados às cadeias L e M. Um dos pares (o "par especial", verde-escuro) é o sítio das primeiras mudanças fotoquímicas após a absorção da luz. Também está incorporado um par de moléculas de feofitina *a* (Feo a, azul-claro); duas quinonas, a menaquinona (Q_A) e a ubiquinona (Q_B) (amarelo), também arranjadas com simetria bilateral, e um único Fe não-heme (vermelho) localizado aproximadamente no eixo de simetria entre as quinonas. No topo da figura estão mostrados quatro grupos heme (vermelho) associados ao citocromo tipo c do centro de reação. O centro de reação de uma outra bactéria púrpura, *Rhodobacter sphaeroides*, é muito similar, exceto que o citocromo c não é parte do complexo cristalino. (**b**) Seqüência de eventos após a excitação do par especial de bacterioclorofilas e a escala de tempo da transferência de elétrons (entre parênteses; ps = picossegundos). O par especial excitado transfere um elétron para a feofitina ①, da qual o elétron se move rapidamente para a menaquinona Q_A que está fortemente ligada à membrana ②. Essa quinona passa os elétrons muito mais vagarosamente para a difusível ubiquinona, Q_B, por meio do Fe não-heme ③. Enquanto isso, a "cela de elétrons" no par especial é preenchida por um elétron do grupo heme do citocromo c ④.

A seqüência extremamente rápida de transferência de elétrons mostrada na Figura 19-45b foi deduzida a partir de estudos físicos dos centros feofitina-quinona da bactéria, usando pulsos curtos de luz para disparar a fototransdução e uma variedade de técnicas espectroscópicas para seguir o fluxo dos elétrons por meio dos vários carregadores. Um par de bacterioclorofilas — "o par especial", designado $(Clo)_2$ — é o sítio da fotoquímica inicial no centro de reação. A energia do fóton absorvido por uma das muitas moléculas de clorofila antena que rodeiam o centro de reação atinge o centro de reação $(Clo)_2$ por transferência de excitons. Quando essas duas moléculas de clorofila, tão próximas que seus orbitais de ligação se superpõem, absorvem um exciton, uma delas abandona um elétron fracamente ligado, que passa por meio do monômero de clorofila vizinha para a feofitina (Feo). Isso produz dois radicais, um possivelmente carregado positivamente (o par especial de clorofilas) e um carregado negativamente (a feofitina):

$$(Clo)_2 + 1 \text{ exciton} \longrightarrow (Clo)_2^* \qquad \text{(excitação)}$$

$$(Clo)_2^* + Feo \longrightarrow (Clo)_2^{\cdot +} + Feo^{\cdot -} \qquad \text{(separação de carga)}$$

O radical feofitina transfere seu elétron para uma molécula de quinona fortemente ligada à membrana (Q_A), convertendo-a em um radical semiquinona que imediatamente doa esse elétron extra a uma segunda quinona (Q_B) fracamente ligada à membrana. Essas duas transferências de elétrons convertem Q_B em sua forma completamente reduzida, Q_BH_2, que difunde livremente na bicamada da membrana para longe do centro de reação:

$$2\,Feo^{\cdot -} + 2H^+ + Q_B \longrightarrow 2\,Feo + Q_BH_2 \qquad \text{(redução da quinona)}$$

A hidroquinona (Q_BH_2), que carrega em suas ligações químicas alguma energia dos fótons que originalmente excitaram o P870, entra em um reservatório de quinona reduzida (QH_2) dissolvido na membrana e se move através da fase lipídica da bicamada até o complexo do citocromo bc_1.

Similarmente ao homólogo complexo III na mitocôndria, o complexo do citocromo bc_1 da bactéria púrpura transporta os elétrons de um doador quinol (QH_2) até um aceptor de elétrons, usando a energia da transferência de elétrons para bombear os prótons através da membrana e produzir uma força próton motriz. Acredita-se que o caminho do fluxo dos elétrons por meio desse complexo é muito similar ao que ocorre pelo complexo III mitocondrial, envolvendo o ciclo Q (Fig. 19-11), em que os prótons são consumidos em um dos lados da membrana e liberados no outro. O aceptor de elétrons final na bactéria púrpura é uma forma do P870 desprovida de elétrons $(Clo)_2^{\cdot +}$ (Fig. 19-44a). Os elétrons movem-se do complexo do citocromo bc_1 para o P870 por meio de um citocromo tipo *c* solúvel, o citocromo c_2. O processo de transferência de elétrons completa o ciclo e o centro de reação retorna ao seu estado não-descorado que absorve rapidamente um outro exciton de uma clorofila antena.

O centro de reação Fe-S (centro de reação tipo I). A fotossíntese nas bactérias sulfurosas verdes envolve os mesmos três módulos como na bactéria púrpura, mas o processo difere em vários aspectos e envolve reações enzimáticas adicionais (Fig. 19-44b). A excitação provoca um movimento dos elétrons do centro de reação para o complexo do citocromo bc_1, via transportador quinona. A transferência de elétrons por meio desse complexo acarreta o transporte de prótons e cria a força próton motriz usada na síntese de ATP, tal como na bactéria púrpura e na mitocôndria. Entretanto, em contraste com o fluxo cíclico de elétrons na bactéria púrpura, alguns elétrons fluem do centro de reação para uma proteína não-heme, **ferredoxina**, que então passa os elétrons via ferredoxina-NAD redutase, produzindo NADH. Os elétrons retirados do centro de reação para reduzir o NAD^+ são substituídos pela oxidação do H_2S a HSO_4^{2-} (Fig. 19-44b), na reação que define a bactéria sulfurosa verde. Essa oxidação do H_2S pela bactéria é quimicamente análoga à oxidação da água pelas plantas superiores.

Fatores cinéticos e termodinâmicos previnem a dissipação de energia pela conversão interna

A construção complexa dos centros de reação é o produto da seleção evolutiva para a eficiência do processo fotossintético. O estado excitado $(\text{Clo})_2^*$ em princípio pode decair para o estado fundamental pela conversão interna, um processo muito rápido (10 picossegundos; ps = 10^{-12}s) no qual a energia absorvida do fóton é convertida em calor (movimento molecular). Os centros de reação são construídos para prevenir a ineficiência que poderia resultar no caso de conversão interna. As proteínas do centro de reação mantêm as bacterioclorofilas, as bacteriofeofitinas e as quinonas em uma orientação fixa em relação às demais. Todavia, as reações fotoquímicas entre esses componentes ocorrem em um estado virtualmente sólido. Isso contribui para a alta eficiência e rapidez das reações, pois não dependem das colisões ao acaso ou difusão randômica. A transferência do exciton da clorofila antena para o par especial do centro de reação ocorre em menos de 100ps com uma eficiência maior que 90%. Três picossegundos após a excitação do P870, a feofitina já recebeu um elétron, tornando-se um radical negativamente carregado. Menos de 200ps após, o elétron já atingiu a quinona Q_B (Fig. 19-45b). As reações de transferência de elétrons não são apenas rápidas mas termodinamicamente "morro abaixo". O par especial excitado $(\text{Clo})_2^*$ é um doador de elétron muito bom ($E'^\circ \approx -1$V) e cada transferência de elétrons sucessiva é sempre para um aceptor com E'° substancialmente mais negativo. A mudança de energia livre padrão para o processo é portanto negativa e grande. Lembrar do Capítulo 14 que $\Delta G'^\circ = -n\mathcal{J}\Delta E'^\circ$, onde $\Delta E'^\circ$ é a diferença entre os potenciais de redução padrão das duas semi-reações:

$$(1) \quad (\text{Clo})_2^* \longrightarrow (\text{Clo})_2^{\cdot+} + e^- \qquad \Delta E'^\circ \approx -1\text{V}$$

$$(2) \quad \text{Q} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{QH}_2 \qquad \Delta E'^\circ = -0{,}045\text{V}$$

Assim, $\Delta E'^\circ = -0{,}045\text{V} - (-1\text{V}) \approx 0{,}95\text{V}$, e

$$\Delta G'^\circ = -2(96{,}5\text{kJ/V} \cdot \text{mol})(0{,}95\text{V}) \approx -180\text{kJ/mol}$$

A combinação de uma cinética rápida com uma termodinâmica favorável torna o processo virtualmente irreversível e altamente eficiente. A energia total produzida pelo processo (a porcentagem da energia do fóton conservada em QH_2) é maior que 30%, sendo que o restante da energia é dissipado como calor.

Nas plantas superiores, dois centros de reação atuam em seqüência

O aparelho fotossintetizador das cianobactérias modernas, algas e plantas superiores é mais complexo que o sistema bacteriano de um centro e parece que ele se desenvolveu a partir da combinação de dois fotocentros bacterianos mais simples. As membranas tilacóides dos cloroplastos apresentam dois tipos diferentes de fotossistemas, cada um com seu próprio centro de reação fotoquímico e um conjunto de moléculas antena. Os dois sistemas possuem funções distintas e complementares (Fig. 19-46). O **fotossistema II (FSII)** é um sistema feofitina-quinona (semelhante ao único fotossistema da bactéria púrpura) que contém quantidades aproximadamente iguais de clorofila *a* e *b*. A excitação do centro de reação P680 impulsiona os elétrons por meio do complexo do citocromo b_6f com o movimento concomitante dos prótons através da membrana tilacóide. O **fotossistema I (FSI)** é do tipo ferredoxina, estrutural e funcionalmente relacionado com o centro de reação da bactéria sulfurosa verde. Ele apresenta um centro de reação denominado P700 e uma proporção elevada de clorofila *a* em relação à *b*. Quando excitado, o P700 passa os elétrons para a proteína ferredoxina Fe-S e então para o $NADP^+$, produzindo NADPH. As membranas tilacóides de um único cloroplasto de espinafre possuem muitas centenas de cada tipo de fotossistema.

Nas plantas, esses dois centros de reação atuam em seqüência para catalisar o movimento dos elétrons da H_2O para o $NADP^+$, impulsionados pela luz (Fig. 19-46). Os elétrons são transportados entre os dois fotossistemas pela proteína solúvel plastocianina, um carregador de um elétron funcionalmente similar ao citocromo *c* da mitocôndria. Para substituir os elétrons que se movem de FSII por meio de FSI para o $NADP^+$, as cianobactérias e as plantas oxidam H_2O (como a bactéria sulfurosa verde oxida H_2S), produzindo O_2 (Fig. 19-46, esquerda inferior). O processo é chamado **fotossíntese oxigênica** para diferenciá-la da fotossíntese não-oxigênica das bactérias púrpura e sulfurosa verde. Toda célula fotossintetizadora produtora de O_2 — aquelas das plantas superiores, algas e cianobactéria — contém tanto FSI como FSII. Organismos com apenas um fotossistema não produzem O_2. O diagrama na Figura 19-46, geralmente chamado **esquema Z** devido à sua forma geral, esboça a via do fluxo dos elétrons entre os dois fotossistemas e as relações de energia nas reações luminosas. Portanto, o esquema Z descreve a via completa por meio da qual os elétrons fluem da H_2O para o $NADP^+$ de acordo com a equação:

$$2\text{H}_2\text{O} + 2\text{NADP}^+ + 8 \text{ fótons} \longrightarrow \text{O}_2 + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+$$

Para cada dois fótons absorvidos (um para cada fotossistema), um elétron é transferido da H_2O para o $NADP^+$. Para formar uma molécula de O_2, que requer a transferência de quatro elétrons de duas H_2O para dois $NADP^+$, um total de oito fótons deve ser absorvido, quatro para cada fotossistema.

Os detalhes mecanísticos das reações fotoquímicas em FSI e FSII são essencialmente similares àqueles dos dois fotossistemas bacterianos. A excitação do P680 (em FSII) produz P680*, um excelente doador de elétrons que, em picossegundos, transfere um elétron à **feofitina**, fornecendo-lhe uma carga negativa (Feo^-) (Fig. 19-46, lado esquerdo). Com a perda do seu elétron, o P680* é transformado em um radical catiônico, designado P680^+. A Feo^- transfere rapidamente seu elétron extra para a **plastoquinona**, PQ_A, uma proteína de membrana que, por sua vez, transfere o elétron para outra plastoquinona, PQ_B, mais fracamente ligada à membrana. Quando PQ_B adquire dois elétrons, por meio de duas transferências de PQ_A e dois prótons da água, ela passa para a sua forma quinol totalmente reduzida, PQ_BH_2. A reação global iniciada pela luz em FSII é:

$$4\ \text{P680} + 4\text{H}^+ + 2\text{PQ}_\text{B} + 4 \text{ fótons} \longrightarrow 4\ \text{P680}^+ + 2\text{PQ}_\text{B}\text{H}_2 \qquad (19\text{-}12)$$

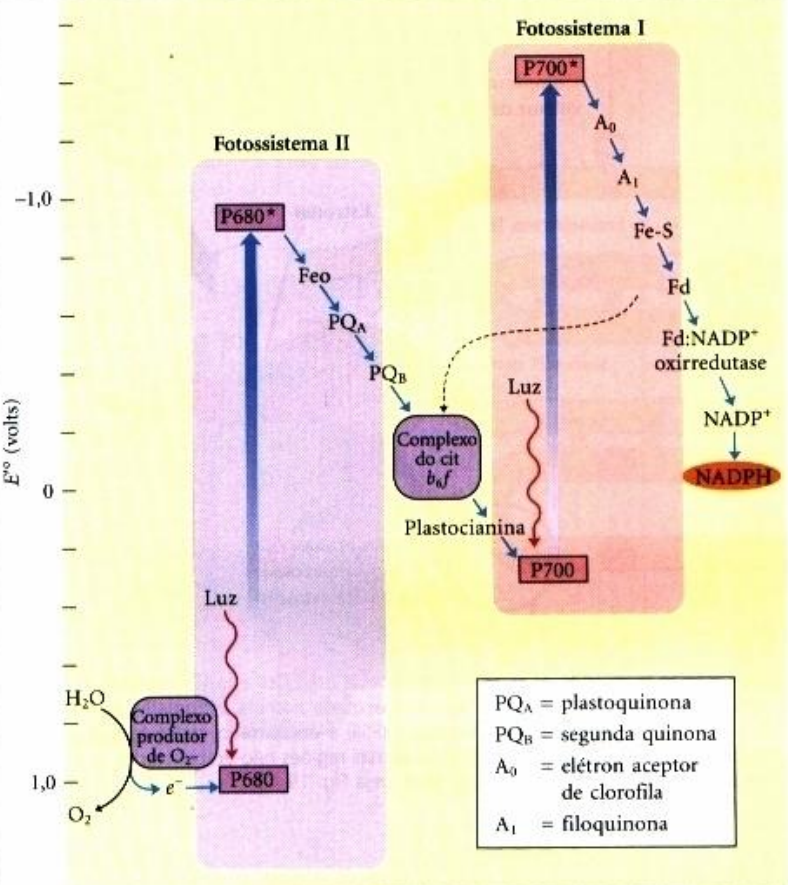


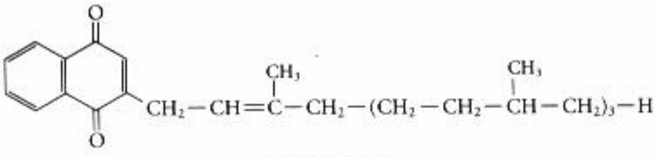
Figura 19-46 – Integração dos fotossistemas I e II nos cloroplastos. Este "esquema Z" mostra a via da transferência de elétrons da H_2O (esquerda inferior) para o $NADP^+$ (direita) na fotossíntese não-cíclica. A posição de cada carregador de elétron na escala vertical reflete o seu potencial de redução padrão. Para aumentar a energia dos elétrons derivados da H_2O no nível requerido para reduzir o $NADP^+$ a NADPH, cada elétron deve ser "erguido" duas vezes (setas grossas) pelos fótons absorvidos em FSI e FSII. Cada elétron requer um fóton em cada fotossistema. Após a excitação, os elétrons de alta energia fluem "morro abaixo" por meio da cadeia de carregadores mostrada na figura. Os prótons se movem através da membrana tilacóide durante a reação de quebra da água, bem como durante a transferência de elétrons por meio do complexo do citocromo b_6f, produzindo um gradiente de prótons que é fundamental para a formação de ATP. A seta tracejada é a via da transferência cíclica do elétron (discutida posteriormente no texto) em que somente FSI está envolvido. Os elétrons retornam a FSI por meio da via cíclica em vez de reduzir o $NADP^+$ a NADPH.

Eventualmente, os elétrons em PQ_BH_2 passam por meio do complexo do citocromo b_6f. O sítio de ligação para a plastoquinona é o local de ação de muitos herbicidas comerciais que matam as plantas bloqueando a transferência de elétrons por meio do complexo do citocromo b_6f e impedindo a produção de ATP por meio da fotossíntese.

Os eventos fotoquímicos que ocorrem após a excitação de FSI (no centro de reação P700) são exatamente similares aos de FSII. O centro de reação P700* excitado perde um elétron para um aceptor A_0 (acredita-se que é uma forma especial de clorofila, funcionalmente análoga à feofitina de FSII), originando A_0^- e $P700^-$ (Fig. 19-46, lado direito). Novamente a excitação resulta em uma separação de carga no centro de reação fotoquímico. O $P700^+$ é um forte agente oxidante, que rapidamente adquire um elétron da **plastocianina**, uma proteína de transferência de elétrons, solúvel, que contém cobre. A_0^- é um agente redutor excepcionalmente forte que passa seu elétron por meio de uma cadeia de transportadores que leva ao $NADP^+$. Inicialmente, a **filoquinona** (A_1) aceita um elétron e o transfere para uma proteína ferro-enxofre (por meio de três centros Fe-S em FSI). A partir daí, o elétron se move para a **ferredoxina** (Fd), uma outra proteína ferro-enxofre fracamente associada à membrana tilacóide. A **ferredoxina** do espinafre (M_r 10.700) contém um centro 2Fe-2S (Fig. 19-5) que sofre oxidação de um elétron e reações de redução. O quarto carregador de elétrons na cadeia é a flavoproteína **ferredoxina-NADP⁺ oxirredutase**, que transfere os elétrons da ferredoxina reduzida (Fd_{red}) para o $NADP^+$:

$$2Fd_{red} + 2H^+ + NADP^+ \longrightarrow 2Fd_{ox} + NADPH + H^+$$

Essa enzima é homóloga à ferredoxina-NAD redutase da bactéria sulfurosa verde (Fig. 19-44b).



Filoquinona

A separação espacial dos fotossistemas I e II impede a fuga de excitons

A energia requerida para excitar FSI (P700) é menor que a requerida para excitar FSII (P680) (comprimento de onda menor corresponde a energia maior). Se FSI e FSII estivessem fisicamente contíguos, os excitons originários do sistema antena de FSII migrariam para o centro de reação de FSI, deixando FSII cronicamente subexcitado e interferindo com a operação do sistema de dois centros. Essa fuga é impedida pela separação de FSI e FSII na membrana tilacóide (Fig. 19-47). FSII fica localizado quase que exclusivamente no conjunto de membranas firmemente justapostas da grana tilacóide (lamela granal) e o seu associado complexo coletor de luz (CCLII) medeia a forte associação das membranas adjacentes na grana. FSI e a ATP sintase estão localizados quase que exclusivamente nas membranas tilacóides não-empacotadas (a lamela estromal), nas quais ambos têm acesso ao conteúdo do estroma, incluindo ADP e $NADP^+$. O complexo do citocromo b_6f está presente em todas as partes da membrana tilacóide.

A associação do CCLII com o FSII é regulada pela intensidade e comprimento de onda da luz. Na luz do sol brilhante (com grande componente de luz azul), FSII absorve mais luz

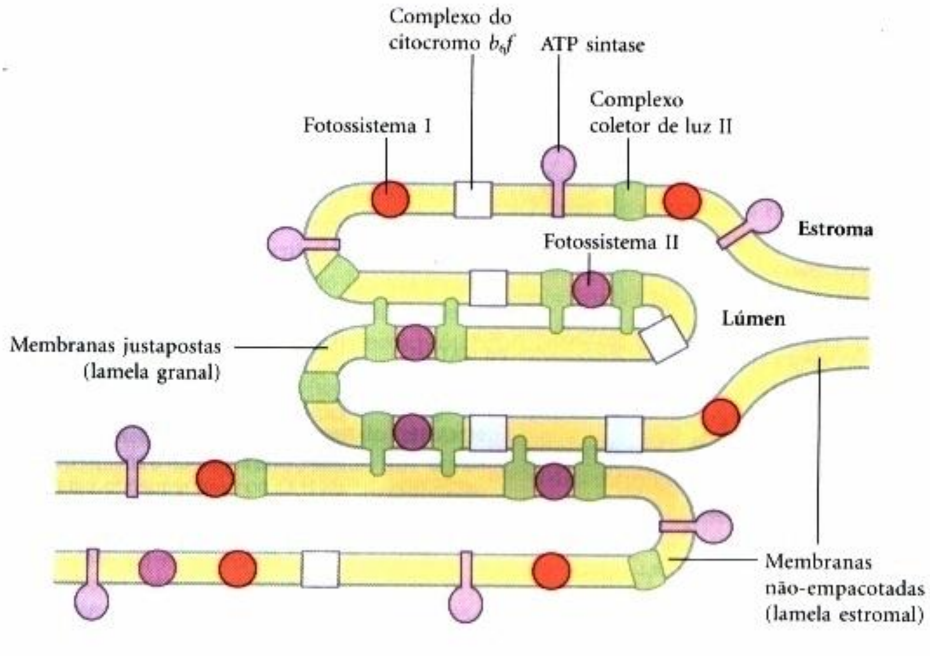

Complexo do citocromo b_6f
ATP sintase
Complexo coletor de luz II
Fotossistema I
Estroma
Fotossistema II
Lúmen
Membranas justapostas (lamela granal)
Membranas não-empacotadas (lamela estromal)

Figura 19-47 – Localização de FSI e FSII nas membranas tilacóides. O complexo coletor de luz CCLII e a ATP sintase estão localizados tanto na região empacotada (lamela granal) como na região não-empacotada (lamela estromal) da membrana tilacóide e têm rápido acesso ao ADP e $NADP^+$ no estroma. O fotossistema II (FSII) é encontrado quase que exclusivamente nas regiões empacotadas e o fotossistema I (FSI) quase que exclusivamente nas regiões não-empacotadas expostas ao estroma. O CCLII é o "adesivo" que mantém as lamelas empacotadas juntas (veja Fig. 19-48).

que FSI e produz plastoquinona reduzida (plastoquinol, PQH_2) mais rápido que FSI consegue oxidá-lo. O resultante acúmulo de PQH_2 ativa uma proteína quinase que fosforila um resíduo de Thr do CCLII (Fig. 19-48). A fosforilação diminui a interação entre CCLII e FSII, e uma parte do CCLII se dissocia e se move para a lamela estromal. Ali ela captura prótons para FSI, aumenta a velocidade de oxidação de PQH_2 e reverte o desequilíbrio entre o fluxo de elétrons em FSI e FSII. Na presença de luz menos intensa, com mais vermelho (na sombra), FSI oxida PQH_2 mais rápido que FSII possa sintetizá-lo, e o aumento resultante da concentração de PQ dispara a desfosforilação de CCLII, revertendo o efeito da fosforilação.

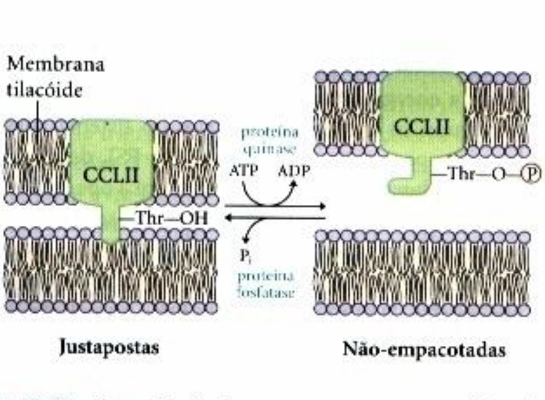


Figura 19-48 – A modulação do empacotamento granal iguala o fluxo de elétrons em FSI e FSII. Um domínio hidrofóbico do complexo coletor de luz CCLII em uma lamela tilacóide se insere em uma lamela vizinha e mantém as duas membranas firmemente justapostas (lamela granal). O acúmulo de plastoquinol estimula uma proteína quinase que fosforila um resíduo de Thr no domínio hidrofóbico de CCLII que, por sua vez, reduz a sua afinidade pela membrana tilacóide vizinha, convertendo a lamela granal em lamela estromal. Uma proteína fosfatase específica reverte essa fosforilação reguladora quando a razão [PQ]/[PQH] aumenta.

O complexo do citocromo b_6f une os fotossistemas I e II

Os elétrons temporariamente armazenados no plastoquinol resultantes da excitação do P680 em FSII são transportados para o P700 de FSI por meio do complexo do citocromo b_6f e da proteína solúvel plastocianina (Fig. 19-46, centro). Similarmente ao complexo III da mitocôndria, o complexo do citocromo b_6f (Fig. 19-49) contém um citocromo tipo *b* com dois grupos heme (denominados b_H e b_L), uma proteína ferro-enxofre Rieske (M_r 20.000), e o citocromo tipo *c*, c_{552}, comumente chamado citocromo *f* (do latim *frons*, significando "folha"). Os elétrons fluem por meio do complexo do citocromo b_6f, do PQ_BH_2 para o citocromo *f* e então para a plastocianina. Finalmente atingem o P700, reduzindo-o.

Tal como o complexo II da mitocôndria, o citocromo b_6f transporta elétrons da quinona reduzida — um carregador móvel de dois elétrons, solúvel em lipídio (Q na mitocôndria e PQ_B nos cloroplastos) — para uma proteína solúvel que transporta um elétron (citocromo *c* na mitocôndria, plastocianina nos cloroplastos). Tal como na mitocôndria, a função desse complexo envolve um ciclo Q (Fig. 19-11), no qual os elétrons passam, um de cada vez, do PQ_BH_2 para o citocromo b_6. Esse ciclo resulta no bombeamento de prótons através da membrana. Nos cloroplastos, a direção do movimento de prótons é do compartimento estromal para o lúmem tilacóide, e cerca de quatro prótons se movem para cada par de elétrons. O resultado é a produção de um gradiente de prótons através da membrana tilacóide à medida que os elétrons passam de FSII para FSI. Uma vez que o lúmen das membranas tilacóides achatadas é pequeno, o influxo de um pequeno número de prótons tem um efeito significativo no pH luminal. A diferença de pH medida entre o estroma (pH 8,0) e o lúmem tilacóide (pH 5,0) representa uma variação de 1.000 vezes na concentração dos prótons — uma poderosa força motriz para a síntese de ATP.

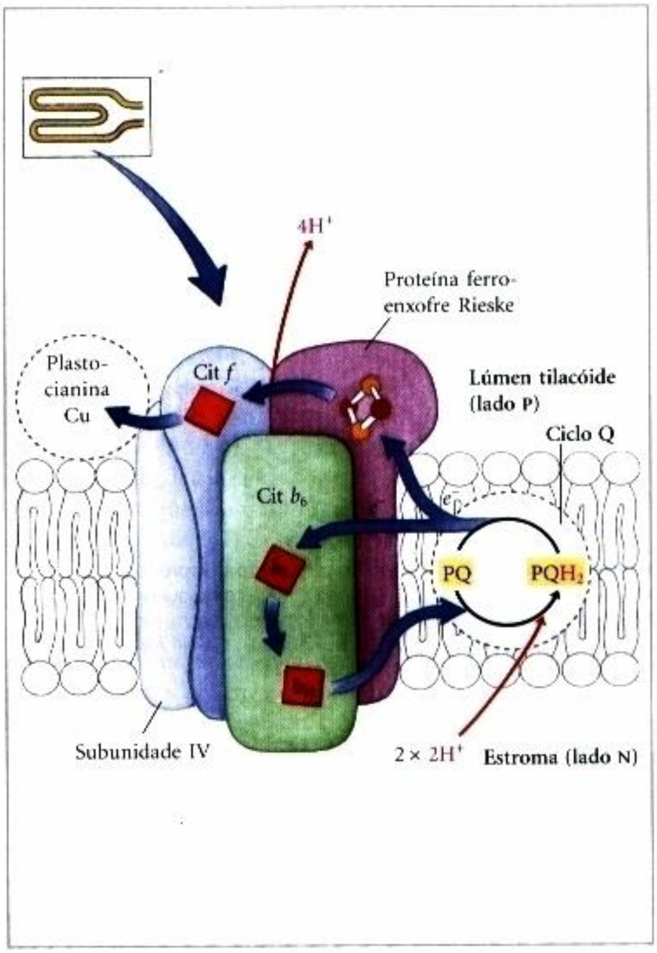


Figura 19-49 – Fluxo de elétrons e prótons por meio do complexo do citocromo b_6f. O plastoquinol (PQH_2) formado em FSII é oxidado pelo citocromo b_6f em várias etapas similares às do ciclo Q no complexo do citocromo bc_1 (complexo III) da mitocôndria (veja Fig. 19-11). Um elétron passa para centro Fe-S da proteína Rieske (púrpura), enquanto os outros, para os hemes do citocromo b_6 (verde). O efeito global é a passagem de elétrons de PQH_2 para a plastocianina, uma proteína solúvel, que então os transporta para FSI.

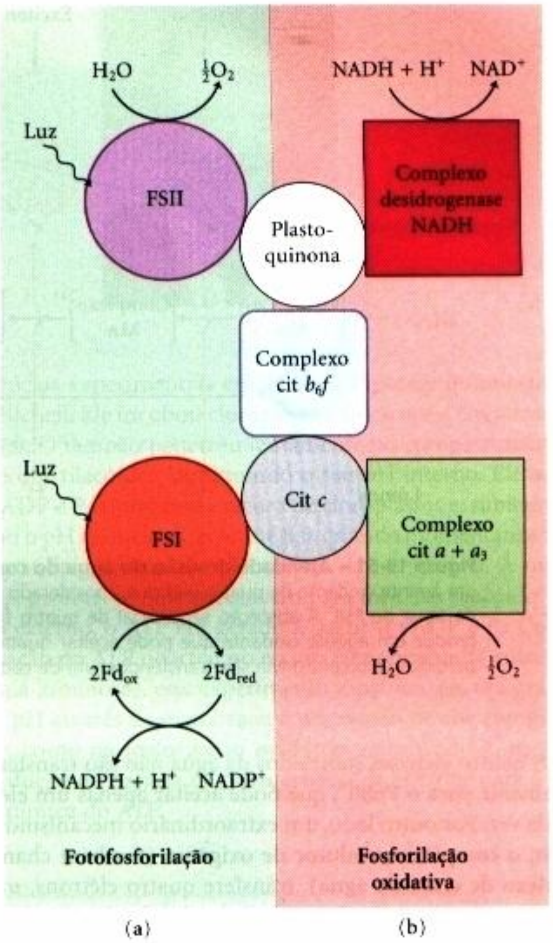


Figura 19-50 – O duplo papel do citocromo b_6f e citocromo c_6 na cianobactéria. Estes organismos utilizam citocromo b_6f, citocromo c_6 e plastoquinona na fosforilação oxidativa e na fotofosforilação. (**a**) Na fotofosforilação, os elétrons fluem da água para o NADP⁺. (**b**) Na fosforilação oxidativa, os elétrons fluem do NADH para o O_2. Ambos os processos são acompanhados pelo movimento de prótons através da membrana, terminando por um ciclo Q.

A cianobactéria utiliza o complexo do citocromo b_6f e o citocromo *c* tanto na fosforilação oxidativa como na fotofosforilação

A cianobactéria pode sintetizar ATP pela fosforilação oxidativa ou fotofosforilação, embora ela não tenha nem mitocôndria nem cloroplastos. A maquinaria enzimática para ambos os processos está em uma membrana plasmática altamente retorcida (veja Fig. 2-5). Dois componentes protéicos funcionam em ambos os processos (Fig. 19-50). O complexo do citocromo b_6f bombeador de prótons transporta elétrons da plastoquinona para o citocromo *c* na fotossíntese. Ele também transporta elétrons da ubiquinona para o citocromo *c* na fosforilação oxidativa, papel esse desempenhado pelo complexo do citocromo bc_1 nas plantas superiores. O citocromo do tipo *c*, c_6, análogo ao citocromo *c* das mitocôndrias, transporta elétrons do complexo III para o complexo IV nas cianobactérias; ele também transporta elétrons do complexo do citocromo b_6f para FSI, um papel desempenhado pela plastocianina. Desse modo, pode-se notar a homologia funcional entre o complexo do citocromo b_6f da cianobactéria e o complexo do citocromo bc_1 das plantas, bem como entre o citocromo c_6 da cianobactéria e a plastocianina das plantas.

A água é quebrada pelo complexo produtor de oxigênio

A principal fonte de elétrons que passam para o NADPH na fotossíntese das plantas (oxigênico) é a água. Tendo doado um elétron para a feofitina, o P680⁺ (de FSII) precisa adquirir um elétron para voltar ao seu estado fundamental, preparando-se para capturar um outro fóton. Em princípio, o elétron requerido deve ser proveniente de compostos orgânicos ou inorgânicos. A bactéria fotossintetizadora utiliza uma variedade de doadores de elétrons para esse propósito — acetato, succinato, malato ou sulfito — dependendo de qual deles está disponível em um dado nicho ecológico. Há cerca de três milhões de anos, a evolução da bactéria fotossintetizadora primitiva (progenitores da cianobactéria moderna) produziu um fotossistema capaz de tomar elétrons de um doador sempre disponível, a água. Nesse processo, duas moléculas de água são quebradas produzindo quatro elétrons, quatro prótons e oxigênio molecular:

$$2H_2O \longrightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$$

Um único fóton de luz visível não tem energia suficiente para quebrar as ligações da água; quatro fótons são requeridos nesta reação de quebra fotolítica.

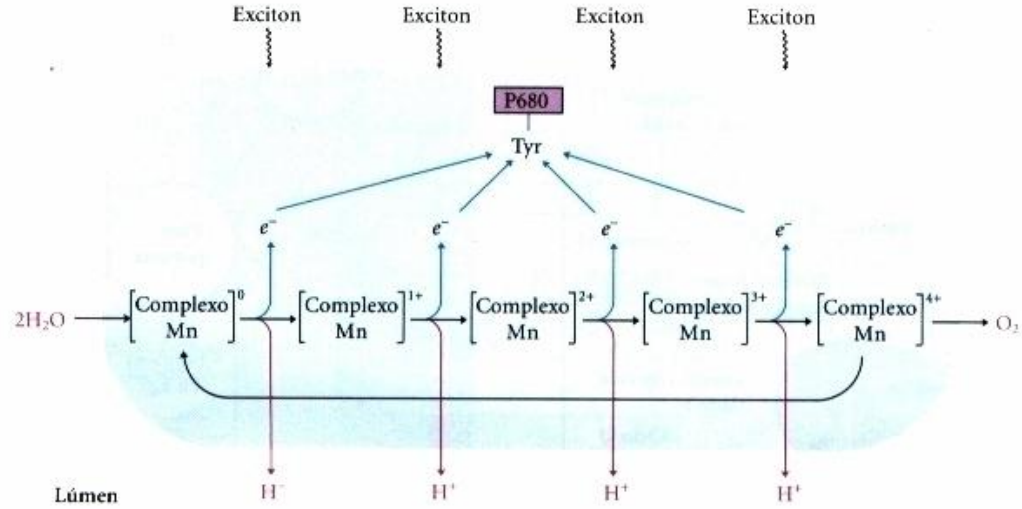


Figura 19-51 – Atividade de cisão da água do complexo produtor de oxigênio. É mostrado o processo que produz um agente oxidante de quatro elétrons, considerado um centro multinuclear com vários íons Mn, no complexo de quebra da água de FSII. A absorção seqüencial de quatro fótons, cada um provocando a perda de um elétron do centro Mn, produz um agente oxidante que pode aceitar quatro elétrons de duas moléculas de água, produzindo O_2. Os elétrons perdidos pelo centro Mn são transferidos, um de cada vez, para um resíduo oxidado de Tyr na proteína FSII.

Os quatro elétrons subtraídos da água não são transferidos diretamente para o $P680^+$, que pode aceitar apenas um elétron de cada vez. Por outro lado, um extraordinário mecanismo molecular, o **complexo produtor de oxigênio** (também chamado **complexo de cisão da água**), transfere quatro elétrons, *um de cada vez*, para $P680^+$ (Fig. 19-51). O doador de elétrons imediato ao $P680^+$ é um resíduo de Tyr (geralmente designado Z ou Tyr_Z) em uma subunidade protéica do centro de reação de FSII. O resíduo de Tyr perde um próton e um elétron, gerando um radical livre Tyr eletricamente neutro, $Tyr^{\cdot}$

$$4\ P680^+ + 4\ Tyr \longrightarrow 4\ P680 + 4\ Tyr^{\cdot} \qquad (19\text{-}13)$$

O radical Tyr recupera seu elétron e próton oxidando um arranjo de quatro íons manganês no complexo de cisão da água. Por meio de cada transferência de um único elétron, o arranjo Mn se torna mais oxidado e as quatro transferências de um único elétron, cada uma correspondendo à absorção de um fóton, produzem uma carga de +4 no complexo Mn (Fig. 19-51):

$$4\ Tyr^{\cdot} + [\text{complexo Mn}]^0 \longrightarrow 4\ Tyr + [\text{complexo Mn}]^{4+} \quad (19\text{-}14)$$

Neste estado, o complexo Mn pode receber quatro elétrons de um par de moléculas de água, liberando $4H^+$ e O_2:

$$[\text{complexo Mn}]^{4+} + 2H_2O \longrightarrow [\text{complexo Mn}]^0 + 4H^+ + O_2 \quad (19\text{-}15)$$

Uma vez que os quatro prótons produzidos na reação são liberados no lúmen tilacóide, o complexo produtor de oxigênio atua como uma bomba de prótons, impulsionada pela transferência de elétrons. O somatório das Equações 19-12 e 19-15 é:

$$2H_2O + 2PQ_B + 4\ \text{fótons} \longrightarrow O_2 + 2\ PQ_BH_2 \qquad (19\text{-}16)$$

Tem sido excepcionalmente difícil purificar essa atividade de cisão da água que está associada ao centro de reação de FSII. Acredita-se que uma proteína periférica de membrana (M_r 33.000) do lado luminal da membrana tilacóide estabilize o complexo Mn. A estrutura detalhada do arranjo Mn ainda não é conhecida. Como o manganês pode existir nos estados de oxidação estáveis desde +2 até +7, esse arranjo de quatro íons certamente pode doar ou aceitar quatro elétrons. O mecanismo mostrado na Figura 19-51 é consistente com fatos experimentais. Entretanto, até que as estruturas químicas exatas de todos os intermediários do arranjo de Mn sejam conhecidas, o mecanismo permanece elusivo.

A Síntese de ATP pela Fosforilação

A atividade combinada dos dois fotossistemas das plantas move os elétrons da água para o $NADP^+$, conservando alguma energia da luz absorvida como NADPH (Fig. 19-46). Simultaneamente, prótons são bombeados através da membrana tilacóide e a energia é conservada como um potencial eletroquímico. Nós veremos agora o processo pelo qual esse gradiente de prótons dirige a síntese de ATP, o outro produto que conserva a energia das reações dependentes da luz.

Em 1954, Daniel Arnon e seus colaboradores descobriram que o ATP é gerado a partir de ADP e P_i durante a transferência de elétrons fotossintetizadora em cloroplastos de espinafre iluminados. O suporte para esses achados veio do trabalho de Albert Frenkel, em que foi detectado que a produção de ATP dependente da luz em estruturas membranosas contendo pigmentos chamadas **cromatóforos**, era proveniente de bactéria fotossintetizadora. Os investigadores concluíram que alguma energia luminosa capturada pelos sistemas fotossintetizadores desses organismos é transformada na energia da ligação fosfato do ATP. Esse processo é chamado **fotofosforilação**, para diferenciá-lo da fosforilação oxidativa na mitocôndria que respira.

Daniel Arnon

André Jagendorf

Um gradiente de prótons acopla o fluxo de elétrons e a fosforilação

Várias propriedades da transferência de elétrons fotossintetizadores e da fotofosforilação nos cloroplastos indicam que o gradiente de prótons tem o mesmo papel que na fosforilação oxidativa da mitocôndria. (1) Os centros de reação, os transportadores de elétrons e as enzimas formadoras de ATP estão localizados em uma membrana impermeável a prótons, a membrana tilacóide, que deve permanecer intacta para suportar a fotofosforilação. (2) A fotofosforilação pode ser desacoplada do fluxo de elétrons por reagentes que promovem a passagem dos prótons através da membrana tilacóide. (3) A fotofosforilação pode ser bloqueada pela venturicidina e compostos similares que inibem a formação do ATP, pela ATP sintase mitocondrial, a partir do ADP e P_i (Tabela 19-4). (4) A síntese de ATP é catalisada pelos complexos F_oF_1, localizados na superfície externa das membranas tilacóides, que são muito semelhantes em estrutura e função aos complexos F_oF_1 da mitocôndria.

As moléculas que transferem elétrons na cadeia dos transportadores conectando FSII e FSI estão orientadas assimetricamente na membrana tilacóide, de forma que o fluxo de elétrons fotoinduzido resulta em uma movimento líquido de prótons através da membrana, do lado estromal para lúmen tilacóide (Fig. 19-52).

Em 1966, André Jagendorf mostrou que um gradiente de pH através da membrana tilacóide (alcalino do lado externo) poderia fornecer a força motriz para gerar ATP. As observações iniciais de Jagendorf forneceram algumas das mais importantes evidências experimentais em apoio à hipótese quimiosmótica de Mitchell. Ele incubou cloroplastos no escuro e em tampão de pH 4,0. O tampão penetrou lentamente no compartimento interno dos tilacóides, diminuindo o seu pH interno. Ele adicionou ADP e P_i à suspensão escura de cloroplastos e, subitamente, elevou o pH do meio externo até 8,0, criando momentaneamente um grande gradiente de pH através da membrana. À medida que os prótons se movimentavam para fora dos tilacóides até o meio externo, o ATP era gerado a partir do ADP e P_i. Como a formação do ATP ocorreu no escuro (sem nenhuma entrada de energia luminosa), esse experimento mostrou que um gradiente de pH através da membrana é um estado de alta energia que pode, como na fosforilação oxidativa mitocondrial, mediar a transdução de energia da transferência de elétrons para a energia química do ATP.

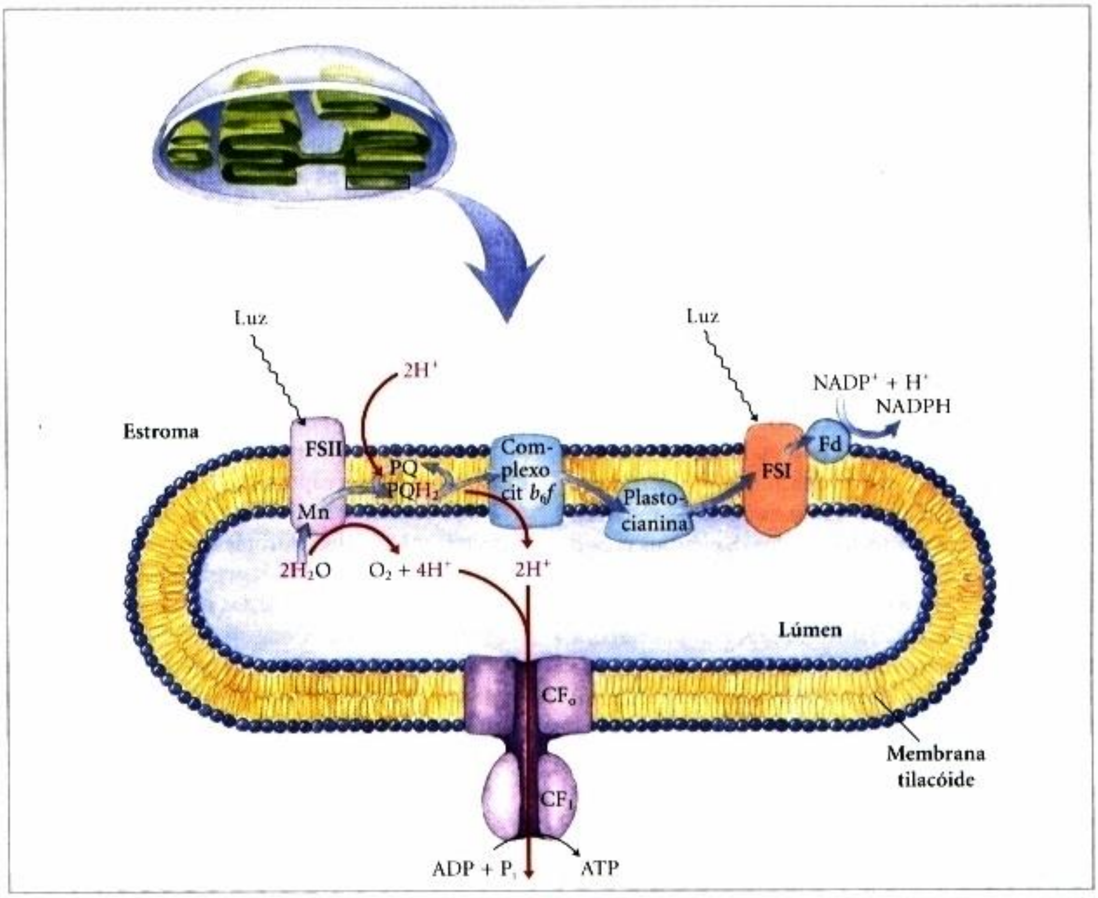


Figura 19-52 – Circuitos dos prótons e dos elétrons nos tilacóides. Os elétrons (setas azuis) se movem da H_2O por meio de FSII, a cadeia intermediária de transportadores FSI e finalmente para o $NADP^+$. Os prótons (setas vermelhas) são bombeados para o lúmen tilacóide pelo fluxo de elétrons por meio da cadeia de transportadores entre FSII e FSI e entram novamente no estroma por meio dos canais de prótons formados pela porção F_o da ATP sintase, designada CF_o na enzima do cloroplasto. A subunidade F_1, CF_1, catalisa a síntese do ATP.

A estequiometria aproximada da fotofosforilação já foi estabelecida

À medida que os elétrons se movem da água para o $NADP^+$, cerca de 12 H^+ se movem do estroma para o lúmen tilacóide, para cada quatro elétrons que passam (isto é, para cada O_2 formado). Quatro desses prótons são transportados pelo complexo produtor de oxigênio, e cerca de oito, pelo complexo do citocromo b_6f. O resultado mensurável é uma diferença de 1.000 vezes na concentração dos prótons através da membrana tilacóide ($\Delta pH = 3$). Lembre-se de que a energia armazenada no gradiente de prótons (o potencial eletroquímico) apresenta dois componentes: uma diferença de concentração de prótons (ΔpH) e um potencial elétrico ($\Delta\psi$) devido à separação de carga. Nos cloroplastos, o ΔpH é o componente dominante. O movimento dos contra-íons aparentemente dissipa a maior parte do potencial elétrico. Nos cloroplastos iluminados, a energia armazenada no gradiente de prótons por mol de prótons é:

$$\Delta G = 2{,}3\ RT \log \Delta pH + Z\mathcal{F}\Delta\psi = -17\text{kJ/mol}$$

assim, o movimento de 12 moles de prótons através da membrana tilacóide representa a conservação de cerca de 200kJ de energia, energia suficiente para conduzir a síntese de vários moles de ATP ($\Delta G'^{\circ} = 30{,}5\text{kJ/mol}$). Medidas experimentais produziram valores de ATP por O_2 de cerca de 3.

Pelo menos oito fótons devem ser absorvidos para impulsionar quatro elétrons da H_2O para o $NADP^+$ (um fóton por elétron em cada centro de reação). A energia nos oito fótons da luz visível é mais que suficiente para a síntese de três moléculas de ATP.

A síntese de ATP não é somente uma reação de conservação de energia da fotossíntese. O NADPH formado no final da transferência de elétrons também é energeticamente rico, similarmente ao seu análogo NADH. A equação global para a fotofosforilação não cíclica (veja a seguir) é:

$$2H_2O + 8\ \text{fótons} + 2NADP^+ + \sim 3ADP + \sim 3P_i \longrightarrow O_2 + \sim 3ATP + 2NADPH \quad (19\text{-}17)$$

O fluxo cíclico de elétrons produz ATP mas não NADPH ou O_2

Uma via alternativa do fluxo de elétrons induzido pela luz permite aos cloroplastos variarem a razão entre NADPH e ATP formados na presença da luz. Ela é chamada **fluxo cíclico de elétrons** para se diferenciar do ciclo normalmente unidirecional ou **fluxo não-cíclico de elétrons** da H_2O para o $NADP^+$. O fluxo cíclico de elétrons (Fig. 19-46) envolve somente FSI. Os elétrons transportados do P700 para a ferredoxina não continuam para o $NADP^+$, mas voltam por meio do complexo do citocromo b_6f para a plastocianina. O caminho dos elétrons se equipara ao da bactéria sulfurosa verde (Fig. 19-44b). A plastocianina doa os elétrons para o P700, que os transfere para a ferredoxina quando iluminada. Desse modo, na luz, FSI pode causar um movimento cíclico dos elétrons para fora do centro de reação de FSI e depois voltando para ele. Cada elétron é impelido ao redor do ciclo pela energia produzida pela absorção de um fóton. O fluxo cíclico dos elétrons não é acompanhado pela formação real de NADPH ou evolução de O_2. Entretanto, ele é acompanhado pelo bombeamento de prótons pelo complexo do citocromo b_6f e pela fosforilação do ADP em ATP, que é denominada **fotofosforilação cíclica**. A equação geral para o fluxo cíclico de elétrons e fotofosforilação é simplesmente:

$$ADP + P_i \xrightarrow{\text{luz}} ATP + H_2O$$

Regulando a partição de elétrons entre o $NADP^+$ e a fotofosforilação cíclica, a planta ajusta a relação entre ATP e NADPH produzidos nas reações dependentes de luz para igualar as suas necessidades em relação a esses produtos nas reações de assimilação de carbono e outros processos biossintetizantes. Conforme será visto no Capítulo 20, as reações de assimilação de carbono requerem ATP e NADPH em uma relação de 3:2.

A ATP sintase dos cloroplastos é similar à da mitocôndria

A enzima responsável pela síntese do ATP nos cloroplastos é um grande complexo com dois componentes funcionais, CF_o e CF_1 (o C denota a sua origem nos cloroplastos). CF_o é um poro de prótons transmembrana composto de várias proteínas integrais de membrana e é homólogo à F_o mitocondrial. CF_1 é um complexo protéico periférico de membrana muito semelhante à F_1 mitocondrial em relação à composição em subunidades, estrutura e função.

A microscopia eletrônica de cloroplastos seccionados mostra complexos da ATP sintase como projeções semelhantes a maçanetas na superfície *externa* (estromal ou N) das membranas tilacóides. Esses complexos correspondem ao complexo da ATP sintase vistos projetando-se na superfície *interna* (matriz ou N) da membrana mitocondrial interna. Dessa forma, tanto a orientação da ATP sintase como a direção do bombeamento dos prótons nos cloroplastos são opostas àquelas na mitocôndria. Em ambos os casos, a porção F_1 da ATP sintase está localizada no lado mais alcalino (N) da membrana, por meio do qual os prótons fluem na direção do seu gradiente de concentração. A direção do fluxo de prótons relativo a F_1 é a mesma nos dois casos: P e N (Fig. 19-53).

Acredita-se que o mecanismo da ATP sintase do cloroplasto também seja essencialmente idêntico àquele da sua análoga mitocondrial. O ADP e o P_i se condensam rapidamente para formar o ATP na superfície da enzima e a liberação desse ATP ligado à enzima requer uma força próton motriz. A catálise rotacional emprega seqüencialmente cada uma das três subunidades β da ATP sintase na síntese e liberação do ATP e na ligação do ADP + P_i (Figs. 19-23, 19-24).

Os cloroplastos provavelmente surgiram de cianobactérias endossimbióticas

Da mesma forma que as mitocôndrias, os cloroplastos contêm o seu próprio DNA e a sua maquinaria sintetizadora de proteínas. Algumas proteínas do cloroplasto são codificadas pelos genes dos cloroplastos e sintetizadas nos cloroplastos, enquanto outras são codificadas por genes nucleares, sintetizadas fora dos cloroplastos e importadas (veja Fig. 27-39b). Quando as células das plantas crescem e se dividem, os cloroplastos dão origem a novos cloroplastos por divisão, durante a qual o seu DNA é replicado e dividido entre cloroplastos filhos. A maquinaria e o mecanismo para a captura de luz, fluxo de elétrons e síntese de ATP nas bactérias fotossintetizadoras são similares em muitos aspectos àqueles dos cloroplastos das plantas superiores. Essas observações levam à hipótese, agora largamente aceita, de que os progenitores evolutivos das modernas células das plantas foram eucariotos primitivos que engolfaram as bactérias fotossintetizadoras e estabeleceram relações endossimbióticas estáveis com elas (veja Fig. 2-15). Por meio de vários critérios, o FSII das plantas pode ter derivado do centro de reação da bactéria púrpura, enquanto o FSI pode ter derivado da bactéria verde.

Os **proclorofitos,** bactérias fotossintetizadoras que contêm a clorofila *a* e a *b*, mas não ficobilinas, são os prováveis progenitores dos cloroplastos das atuais plantas superiores. Comparações das seqüências de DNA em genes que codificam proteínas do fotossistema nas plantas superiores e nos proclorofitos suportam essa relação evolutiva. A cianobactéria utiliza a clorofila *a* e ficobilinas para coletar luz e provavelmente são os progenitores dos cloroplastos das atuais algas vermelhas, que também usam a clorofila *a* e ficobilinas.

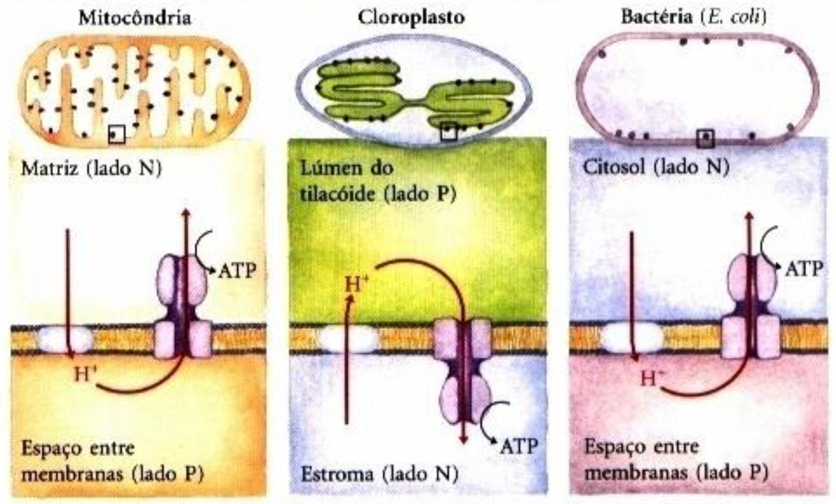


Figura 19-53 – Comparação da topologia do movimento dos prótons e da orientação da ATP sintase nas membranas da mitocôndria, cloroplastos e bactéria *E. coli*. Em cada caso, a orientação do gradiente de prótons em relação à ATP sintase é a mesma.

Diversos organismos fotossintetizadores usam doadores de hidrogênio diferentes da água

Pelo menos metade da atividade fotossintetizadora na Terra ocorre em microrganismos, tais como algas, outros eucariotos fotossintetizadores e bactérias fotossintetizadoras. A cianobactéria apresenta os sistemas FSII e FSI em seqüência e o sistema FSII apresenta uma atividade de cisão de H_2O, muito parecida com aquela das plantas. Entretanto, os outros grupos de bactérias fotossintetizadoras apresentam um único centro de reação e não quebram a água ou produzem O_2. Muitas são anaeróbicos restritos e não toleram O_2. Elas devem usar como doador de elétron algum composto diferente da água. Algumas bactérias fotossintetizadoras usam compostos inorgânicos como doadores de elétrons (e hidrogênio). Por exemplo, a bactéria sulfurosa verde utiliza H_2S:

$$2H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2S$$

Essas bactérias, em vez de produzir O_2 molecular, produzem enxofre elementar como produto de oxidação do H_2S. Outras bactérias fotossintetizadoras usam compostos orgânicos tal como o lactato como doadores de elétrons:

$$2\ \text{Lactato} + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\ \text{piruvato}$$

A similaridade fundamental entre a fotossíntese das plantas e a das bactérias, apesar das diferenças nos doadores de elétrons que elas empregam, torna-se mais óbvia quando a equação da fotossíntese é escrita em uma forma mais geral:

$$2H_2D + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2D$$

onde H_2D é um doador de elétrons (hidrogênio) e D é a sua forma oxidada. H_2D pode ser água, sulfeto de hidrogênio, lactato ou algum outro composto orgânico, dependendo das espécies. É muito provável que a bactéria que primeiro desenvolveu habilidade fotossintetizadora utilizou H_2S como fonte de elétrons e que, somente após o desenvolvimento posterior da fotossíntese oxigênica (há cerca de 2,3 bilhões de anos), o oxigênio representa uma significativa proporção da atmosfera terrestre. Com esse desenvolvimento, a evolução do sistema de transferência de elétrons que usa O_2 como seu principal aceptor de elétrons tornou-se possível, culminando com a extração de energia altamente eficiente da fosforilação oxidativa.

Na bactéria halofílica, uma única proteína absorve luz e bombeia prótons para direcionar a síntese de ATP

A bactéria halofílica ("que gosta de sal") *Halobacterium salinarum*, uma arquebactéria derivada de um progenitor evolutivo muito antigo, capta a energia da luz solar por meio de um processo muito diferente do mecanismo fotossintetizador já descrito. Essa bactéria vive somente em lagoas de salmoura e lagos salgados (Grande Lago Salgado ou Mar Morto, por exemplo), onde a alta concentração salina, que pode exceder a 4M, resulta da perda de água por evaporação. De fato, a holobactéria não consegue viver em concentrações de NaCl menores que 3M. Esses organismos são aeróbicos e normalmente usam o O_2 para oxidar as moléculas orgânicas combustíveis. Entretanto, a solubilidade do O_2 é tão baixa nas lagoas de salmoura que, algumas vezes, o metabolismo oxidativo deve ser suplementado pela luz solar como uma fonte alternativa de energia.

A membrana plasmática da *H. salinarum* contém regiões de pigmentos que absorvem luz, **bacteriorrodopsina**, que contém o retinal (aldeído derivado da vitamina A; veja Fig. 11-19) como grupo prostético. Quando as células são iluminadas, o *trans*-retinal (retinal com todas as suas duplas ligações na forma *trans*) ligado à bacteriorrodopsina absorve um fóton e sofre fotoisomerização para 13-*cis*-retinal. A restauração do *trans*-retinal é acompanhada pela liberação de prótons para fora da célula através da membrana plasmática. A bacteriorrodopsina, com apenas 247 resíduos de aminoácidos, é a mais simples bomba de prótons impulsionada pela luz. A diferença na estrutura tridimensional da bacteriorrodopsina no escuro e após iluminação (Fig. 19-54a) sugere uma via por meio da qual uma série ajustada de "saltos" de prótons pode mover efetivamente um próton através da membrana à medida que a modificação conformacional ocorre. O cromóforo retinal fica ligado ao grupo ε-amino da lisina por meio de uma ligação do tipo base de Schiff. No escuro, o N dessa base de Schiff é protonado, mas a fotoisomerização do retinal diminui o pK_a desse grupo e ele libera seu próton para um resíduo Asp nas proximidades, iniciando uma série de saltos de prótons que fundamentalmente resultam na liberação de um próton na superfície externa da membrana (Fig. 19-54b).

O potencial eletroquímico resultante impulsiona os prótons de volta para a célula por meio do complexo ATP sintase ligado à membrana que é muito similar ao da mitocôndria e do cloroplasto. Assim, a holobactéria pode usar a luz como fonte para suplementar o ATP sintetizado pela fosforilação oxidativa quando o O_2 é limitado. Entretanto, a holobactéria não produz O_2 nem efetua a fotorredução do $NADP^+$. Sua maquinaria fototransdutora é, contudo, mais simples que a da cianobactéria e plantas superiores. Todavia, o mecanismo de bombeamento de prótons usado por essa única proteína representa o protótipo de muitas outras, mais complexas, bombas de íons.

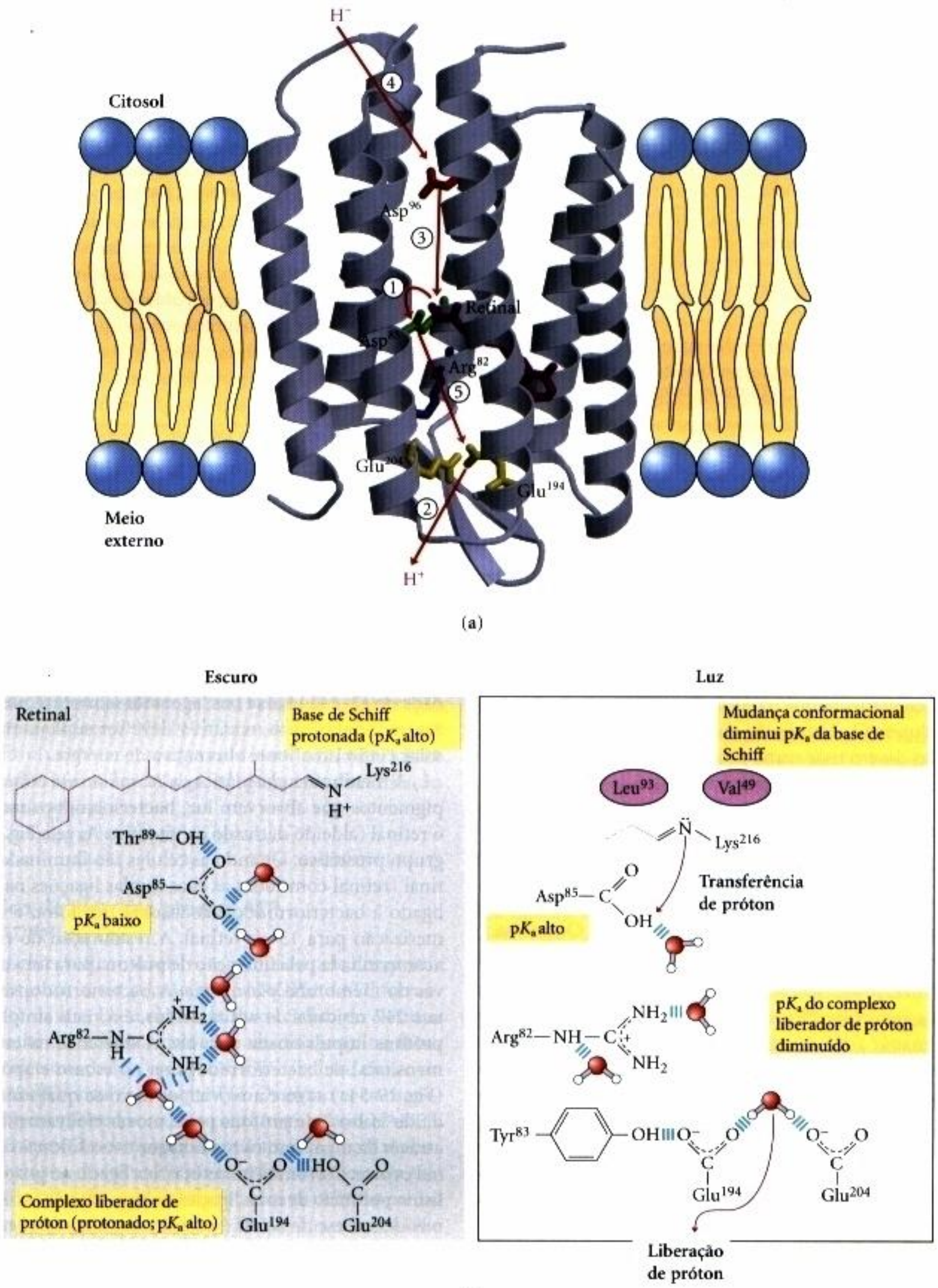

H⁺
Citosol
④
Asp⁹⁶
③
①
Retinal
Asp⁸⁵
Arg⁸²
⑤
Glu²⁰⁴
Glu¹⁹⁴
②
Meio
externo
H⁺
(a)
Escuro
Retinal
Base de Schiff protonada (pKₐ alto)
Lys²¹⁶
N
H⁺
Thr⁸⁹—OH
Asp⁸⁵—C
O⁻
pKₐ baixo
NH₂
Arg⁸²—N—C
H
NH₂
O⁻
O
HO
O
C
C
Complexo liberador de próton (protonado; pKₐ alto)
Glu¹⁹⁴
Glu²⁰⁴
Luz
Mudança conformacional diminui pKₐ da base de Schiff
Leu⁹³
Val⁴⁹
N̈
Lys²¹⁶
Asp⁸⁵—C
O
OH
Transferência de próton
pKₐ alto
Arg⁸²—NH—C
NH₂
NH₂
pKₐ do complexo liberador de próton diminuído
Tyr⁸³
OH
O⁻
O
O⁻
O
C
C
Glu¹⁹⁴
Glu²⁰⁴
Liberação de próton
(b)

Figura 19-54 – Bombeamento de prótons dirigido pela luz pela bacteriorrodopsina. (**a**) A bacteriorrodopsina (M_r 26.000) tem sete α-hélices que atravessam a membrana. O cromóforo *trans*-retinal (púrpura) está ligado covalentemente via base de Schiff a um grupo ε-amino de um resíduo de Lys mergulhado no interior da membrana. Espalhados ao longo da proteína estão vários resíduos de Asp e Glu e várias moléculas de água intimamente associadas que, juntas, proporcionam a via transmembrana de prótons (setas vermelhas). Os passos ① a ⑤ indicam os movimentos de prótons descritos a seguir. (**b**) No escuro (painel esquerdo), a base de Schiff é protonada. A iluminação (painel direito) fotoisomerisa o retinal forçando mudanças conformacionais súbitas na proteína que alteram a distância entre a base de Schiff e seus resíduos de aminoácidos vizinhos. A interação com esses vizinhos diminui o pK_a da base de Schiff e ela doa seu próton para o grupo carboxílico de um Asp^{85} próximo (passo ① em (**a**)). Isso inicia uma série ajustada de saltos de prótons entre as moléculas de água (veja Fig. 4-12) no interior da proteína, que termina com o passo ②, a liberação de um próton que foi compartilhado pelo Glu^{194} e Glu^{204} próximo à superfície extracelular. A base de Schiff readquire o próton do Asp^{96} (③) que, por sua vez, toma um próton do citosol (④). Finalmente, o Asp^{85} doa o seu próton, acarretando a protonação do par Glu^{204}-Glu^{194} (⑤). O sistema agora está preparado para um outro ciclo de bombeamento de prótons.

Resumo

A teoria quimiosmótica fornece o arcabouço intelectual para o entendimento de muitas transduções de energia biológicas, incluindo os processos de fosforilação oxidativa e a fotofosforilação. O mecanismo de acoplamento da energia é semelhante em ambos os casos: a energia do fluxo de elétrons é conservada pelo bombeamento concomitante de prótons através da membrana, produzindo um gradiente eletroquímico, a força próton motriz.

Na mitocôndria, os átomos de H removidos dos substratos pelas desidrogenases ligadas ao NAD doam elétrons para a cadeia respiratória (transferência de elétrons), que os transferem ao O_2 molecular, reduzindo-o a H_2O. Sistemas de lançadeiras transferem os equivalentes redutores do NADH citosólico ao NADH mitocondrial. Os equivalentes redutores de todas as desidrogenações ligadas ao NAD são transferidos à NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I). Eles então passam por meio de uma série de centros Fe-S para a ubiquinona, que transfere os elétrons ao citocromo *b*, o primeiro transportador no complexo III. Nesse complexo, os elétrons passam por meio de dois citocromos do tipo *b* e do citocromo c_1 antes de atingir um centro Fe-S. O centro Fe-S passa os elétrons, um de cada vez, através do citocromo *c* para o complexo IV, citocromo oxidase. Essa enzima que contém cobre e também os citocromos *a* e a_3 acumulam elétrons, passando-os então para o O_2, que é reduzido a H_2O.

Alguns elétrons entram nessa cadeia de carregadores através de vias alternativas. O succinato, por exemplo, é oxidado pela succinato desidrogenase (complexo II), que contém uma flavoproteína (com FAD), que passa os elétrons para a ubiquinona através de vários centros Fe-S. Os elétrons derivados da oxidação dos ácidos graxos passam para a ubiquinona através da flavoproteína de transferência de elétrons (FTE).

O fluxo de elétrons por meio dos complexos I, III e IV resulta no bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, tornando a matriz alcalina em relação ao espaço intermembranoso. Esse gradiente de prótons fornece a energia (força próton motriz) para a síntese do ATP a partir do ADP e P_i pela ATP sintase da membrana interna (complexo F_oF_1). Essa enzima promove a "catálise rotacional", em que o fluxo de prótons, por meio de F_o, faz com que cada um dos sítios de ligação dos nucleotídeos em F_1 oscilem entre as configurações (ADP + P_i) ligado, ATP ligado e vazia. A formação de ATP na enzima requer pouca energia e o papel da força próton motriz é empurrar o ATP do seu sítio de ligação na sintase. As bactérias realizam a fosforilação oxidativa por mecanismos essencialmente semelhantes, usando os transportadores de elétrons e uma ATP sintase, na membrana plasmática. A fosforilação oxidativa, que produz a maioria do ATP requerido pelas células aeróbicas, é regulada pelas demandas de energia celular. No tecido adiposo marrom, que é especializado para a produção do calor metabólico, a transferência de elétrons está desacoplada da síntese de ATP e a energia da oxidação de ácidos graxos é, portanto, dissipada como calor.

A fotofosforilação nos cloroplastos das plantas verdes e nas cianobactérias também envolve o fluxo de elétrons por meio de uma série de transportadores ligados à membrana. Nas reações luminosas das plantas, a absorção de um fóton excita as moléculas de clorofila e outros pigmentos (acessórios) que canalizam a energia para os centros de reação nas membranas tilacóides. Nos centros de reação, a fotoexcitação resulta em uma separação de carga que produz um bom doador de elétrons (agente redutor) e um bom aceptor de elétrons. As bactérias apresentam um único centro de reação; nas bactérias púrpuras, ele é do tipo feofitina-quinona, e na bactéria sulfurosa verde, do tipo Fe-S. Estudos estruturais do centro de reação da bactéria púrpura proporcionaram informações sobre o fluxo de elétrons impulcionados pela luz de um par especial excitado de moléculas de clorofila, por meio da feofitina para as quinonas. Os elétrons então passam das quinonas através do complexo do citocromo bc_1 de volta para o centro de reação. Uma via alternativa, na bactéria sulfurosa verde, envia elétrons das quinonas reduzidas para o NAD^+. O fluxo de elétrons por meio do complexo do citocromo bc_1 impulsiona os prótons através da membrana plasmática, criando uma força próton motriz que fornece a energia para a síntese do ATP por uma ATP sintase similar à da mitocôndria.

A cianobactéria e as plantas apresentam dois centros de reações diferentes que funcionam juntos. O fotossistema I das plantas passa elétrons do seu centro de reação excitado, P700, por meio de uma série de transportadores até a ferredoxina que, então, reduz o $NADP^+$ a NADPH. O centro de reação, P680, do fotossistema II passa elétrons para a plastoquinona, e os elétrons perdidos pelo P680 são substituídos por elétrons retirados da H_2O (outros doadores de hidrogênio, diferentes da H_2O, são usados em outros organismos). Essa cisão da H_2O provocada pela luz é catalisada por um complexo protéico contendo Mn, com produção de O_2. A plastoquinona reduzida transporta elétrons para o complexo do citocromo b_6f. Daí eles passam para a plastocianina e, então, para o P700, para substituir os elétrons perdidos durante a fotoexcitação. A cisão da água e o fluxo de elétrons por meio do complexo do citocromo b_6f são acompanhados pelo bombeamento de prótons através da membrana tilacóide, e a força próton motriz assim criada conduz a síntese de ATP por um complexo CF_oCF_1, muito semelhante ao complexo F_oF_1 da mitocôndria. Dessa forma, esse fluxo de elétrons por meio dos fotossistemas II e I produz NADPH e ATP em uma razão de 2:3. Um segundo tipo de fluxo de elétrons (fluxo cíclico) produz apenas ATP e permite uma variabilidade nas proporções de NADPH e ATP formados. A localização de FSI e FSII entre as lamelas granal e estromal é variável e controlada indiretamente pela intensidade luminosa, otimizando a distribuição de excitons entre FSI e FSII para uma captura eficiente de energia.

Tanto a mitocôndria quanto os cloroplastos contêm os seus próprios genomas e, acredita-se, que eles tenham se originado de procariotos endossimbiontes das células eucariotas primitivas. A fosforilação oxidativa nas bactérias aeróbicas e a fotofosforilação nas bactérias fotossintetizadoras são muito semelhantes, na maquinaria e no mecanismo, aos processos homólogos nas mitocôndrias e nos cloroplastos. A cianobactéria utiliza vários complexos enzimáticos tanto na fosforilação oxidativa quanto na fotofosforilação, ilustrando a similaridade entre os dois processos. A bacteriorrodopsina é a bomba de prótons impulsionada pela luz e o sistema fotossintetizador mais simples e mais bem compreendido.

Leitura Adicional

História e formação geral

Arnon DI. (1984) The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 258-262.

Beinert H. (1995) These are the moments when we live! From Thunberg tubes and manometry to phone, fax and FedEx. In *Selected Topics in the History of Biochemistry: Personal Recollections*, IV, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Uma atraente narrativa pessoal do excitante período em que a bioquímica da transferência de elétrons da respiração foi formulada.

Blankenship RE, Madigan MT, & Bauer CE (eds). (1995) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Advances in Photosynthesis, Vol. 2, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

Os 60 capítulos cobrem cada aspecto da fotossíntese em bactérias.

Gray MW, Berger G, & Lang BF. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.

Harold FM. (1986) *The Vital Force: A Study in Bionergetics*, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma síntese muito fácil de ser lida sobre os princípios da bioenergética e sua aplicação nas transduções de energia.

Harris DA. (1995) *Bioenergetics at a Glance*, Blackwell Science, London.

Um curto sumário bem escrito e bem ilustrado das transduções de energia na mitocôndria, cloroplastos e bactéria.

Heldt WH. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford.

Um livro-texto de bioquímica de planta com excelentes discussões sovre fotofosforilação.

Keillin D. (1966) *The History of Cell Respiration and Cytochrome*, Cambridge University Press, London.

Um relato absorvente e competente da descoberta dos citocromos e dos seus papéis na respiração, escrito pelo descobridor dos citocromos.

Mitchell P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* **206**, 1148-1159.

A conferência Nobel de Mitchell, resumindo a evolução da hipótese quimiosmótica.

Ort DR, Yocum CF, & Heichel IF. (eds) (1996) *Oxygenic Photosynthesis: The Ligth Reactions*, Advances in Photosynthesis, Vol. 4, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Um compreensivo tratado avançado.

Raghavendra AS. (ed) (1998) *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. Cambridge University Press.

Um tratamento avançado de todos os aspectos da fotossíntese.

Skulachev VP. (1992) The laws of cell energetics. *Eur. J. Biochem.* **208**, 203-209.

Discussão sobre a inconvertibilidade do ATP e gradientes iônicos.

Slater EC. (1987) The mechanism of the conservation of energy of biological oxidations. *Eur. J. Biochem.* **166**, 489-504.

Um relato claro e crítico da evolução do modelo quimiosmótico.

FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Fluxo de elétrons da respiração

Babcock GT & Wickström M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**, 301-309.

Uma discussão avançada sovre a redução da água e o bombeamento de prótons pela citocromo oxidase.

Brandt U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH-ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 79-91.

Uma discussão avançada sobre os modelos para o movimento dos elétrons através do complexo I.

Brandt U & Trumpower B. (1994) The proton motive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 165-197.

Crofts AR & Berry EA. (1998) Structure and function of cytochrome bc_1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 501-509.

Douce R & Neuburger M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 371-414.

Uma focalização nas características das mitocôndrias das plantas que as distinguem das mitocôndrias das células animais.

Michel H, Behr J, Harrenga A, & Kannt A. (1998) Cytochrome *c* oxidase: structure and spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329-356.

Uma revisão avançada da estrutura e função do complexo IV.

Rottemberg H. (1998) The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 1-16.

Soole KI & Menz RI. (1995) Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenases of plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 397-406.

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, & Yoshikawa S. (1996) The hole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8Å. *Science* **272**, 1136-1144.

A solução da estrutura desta enorme proteína de membrana por meio de cristalografia de raios X.

Vanlerberghe GC. (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 703-734.

Um revisão avançada da oxidase alternativa de mitocôndria de planta.

Xia D, Yu C, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, & Diesenhofer J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**, 60-66.

Estrutura cristalográfica do complexo III.

Acoplamento da síntese do ATP ao fluxo de elétrons respiratório

Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, & Walker JE. (1994) The structure of F$_1$-ATPase from bovine heart mitochondria determined at 2.8Å resolution. *Nature* **370**, 621-628.

Bianchet MA, Hullihen J, Pedersen PL, & Amzel LM (1998) The 2.80Å structure of rat liver F$_1$-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis-hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11065-11070.

Um artigo de pesquisa que traz detalhes estruturais importantes que suportam o mecanismo catalítico.

Boyer PD. (1997) The ATP synthase–a splendid molecular machine. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 717-749.

Uma narrativa sobre o desenvolvimento histórico e o estado atual do modelo da troca de ligação, escrita pelo seu principal arquiteto.

Hinkle PC, Kumar MA, Resetar A, & Harris DL. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576-3582.

Uma cuidadosa análise dos resultados experimentais e considerações teóricas sobre a questão das razões P/O não inteiras.

Junge W, Lill H, & Engelbrecht S. (1997) ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 420-424.

Uma descrição curta e clara da evidência para o movimento rotatório da ATP sintase.

Khan S. (1997) Rotary chemiosmotic machines. *Biochim. Biophys. Acta* **1322**, 86-105.

Uma revisão detalhada das estruturas que sustentam o movimento rotacional da ATP sintase e flagelos de bactéria.

Kinosita KJr., Yasuda R, Noji H, Ishiwata S, & Yoshida M. (1998) F$_1$ATPase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell* **93**, 21-24.

Uma curta revisão da evidência para a rotação da ATP sintase.

Sambongi Y, Iko Y, Tanabe M, Omote H, Iwamoto-Kihara A, Ueda I, Yanagida T, Wada Y, & Futai M (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F$_o$F$_1$): direct observation. *Science* **286**, 1722-1724.

Uma evidência experimental para a rotação do cilindro completo das subunidades c em F$_o$F$_1$.

Stock D, Leslie AGW, & Walker JE. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705.

A primeira visão cristalográfica da subunidade F$_o$ na F$_o$F$_1$ de levedura. Veja também o comentário editorial de R.H. Fillingame no mesmo volume de *Science*.

Weber J & Senior AE. (1997) Catalytic mechanism of F$_1$-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**, 19-58.

Uma revisão avançada das evidências cinética, estrutural e bioquímica para o mecanismo da ATP sintase.

Yasuda R, Noji H, Kinosita Jr.K, & Yoshida M. (1998) F$_1$-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* **93**, 1117-1124.

Demonstração gráfica da rotação da ATP sintase.

Regulação da fosforilação oxidativa da mitocôndria

Brand MD & Murphy MP. (1987) Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **62**, 141-193.

Uma descrição avançada do controle respiratório.

Harris DA & Das AM. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* **280**, 561-573.

Discussão avançada sobre a regulação da ATP sintase por Ca^{2+} e outros fatores.

Klingenberg M & Huang SG. (1999) Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**, 271-296.

Doenças da mitocôndria

Schapira AHV. (1999) Mitochondrial disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 99-102.

Uma pequena introdução editorial a um volume completo (oito revisões) sobre o papel da mitocôndria em doenças humanas.

Wallace DC. (1997) Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* **277** (Agosto), 40-47.

Wallace DC. (1999) Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1487.

FOTOSSÍNTESE

Coletando energia luminosa

Cogdell RJ, Isaacs NW, Howard TD, McLuskey K, Fraser NJ, & Prince SM. (1999) How photosynthetic bacteria harvest solar energy. *J. Bacteriol.* **181**, 3869-3879.

Uma pequena revisão de nível médio da estrutura e função do complexo coletor de luz da bactéria púrpura e fluxo de exciton para o centro de reação.

Green BR, Pichersky E, & Kloppstech K. (1991) Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 181-186.

Uma descrição de nível médio das proteínas que orientam as moléculas de clorofila nos cloroplastos.

Zuber H. (1986) Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 414-419.

Fluxo de elétrons impulsionados pela luz

Cogdell RJ, Isaacs NW, Howard TD, McLuskey K, Fraser NJ, & Prince SM. (1999) How photosynthetic bactéria harvest solar energy. *J. Bacteriol.* **181**, 3869-3879.

Revisão dos recentes desenvolvimentos na química e biologia dos coletores de luz das bactérias e do centro de fotorreação.

Deisenhofer J & Michel H. (1991) Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 1-23.

A estrutura do centro de reação da bactéria púrpura e implicações para a função dos centros de reação das bactérias e plantas.

Huber R. (1990) A structural basis of light energy and electron transfer in biology. *Eur. J. Biochem.* **187**, 283-305.

Conferência Nobel de Huber descrevendo a física e a química das fototransduções. Uma discussão excepcionalmente clara e bem ilustrada baseada em estudos cristalográficos dos centros de reação.

Jagendorf AT. (1967) Acid-base transitions and phosphorylation by chloroplasts. *Fed. Proc.* **26**, 1361-1369.

O experimento clássico que estabeleceu a capacidade do gradiente de próton de comandar a síntese de ATP no escuro.

Kerfeld CA & Krogmann DW. (1998) Photosynthetic cytochromes *c* in cyanobacteria, algae, and plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 397-425.

Complexo de cisão da água

Rögner M, Boekema EJ, & Barber J. (1996) How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 21, 44-49.

Szalai VA & Brudvig GW. (1998) How plants produce dioxygen. *Am. Sci.* **86**, 542-551.

Uma introdução bem ilustrada do complexo produtor de oxigênio nas plantas.

Bacteriorrodopsina

Luecke H, Schobert B, Richter H-T, Cartailler JP, & Lanyi JK. (1999) Structural changes in bacteriorodopsin during ion transport at 2 angstron resolution. *Science* **286**, 255-264.

Este artigo e um comentário editorial, no mesmo número do *Science*, descrevem o modelo para a translocação de H$^+$ por meio do salto de prótons.

Problemas

1. Reações de oxidação-redução. O complexo da NADH desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial promove as seguintes séries de reações de oxidação-redução, em que o Fe^{3+} e o Fe^{2+} representam o Fe nos centros ferro-enxofre, Q é a ubiquinona, QH_2 é o ubiquinol e E é a enzima:

(1) $NADH + H^+ + E\text{-}FMN \rightarrow NAD^+ + E\text{-}FMNH_2$
(2) $E\text{-}FMNH_2 + 2Fe^{3+} \rightarrow E\text{-}FMN + 2Fe^{2+} + 2H^+$
(3) $2Fe^{2+} + 2H^+ + Q \rightarrow 2Fe^{3+} + QH_2$

Soma: $NADH + H^+ + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2$

Para cada uma das três reações catalisadas pelo complexo da NADH desidrogenase identifique: (a) o doador de elétrons; (b) o aceptor de elétrons; (c) o par redox conjugado; (d) o agente redutor; (e) o agente oxidante.

2. Todas as partes da ubiquinona têm uma função. Na transferência de elétrons, somente a porção quinona da ubiquinona sofre oxidação-redução, enquanto a porção isoprenóide permanece inalterada. Qual é a função desta cadeia?

3. O uso do FAD em vez do NAD^+ na oxidação do succinato. Todas as desidrogenases da glicólise e do ciclo do ácido cítrico usam NAD^+ (E'° para o $NAD^+/NADH$ é –0,32V) como aceptor de elétrons, exceto a succinato desidrogenase, que usa o FAD covalentemente ligado (E'° para o $FAD/FADH_2$ nessa enzima é 0,05V). Por que o FAD é um aceptor de elétrons mais apropriado que o NAD^+ na desidrogenação do succinato baseado na comparação dos valores de E'° para o par fumarato/succinato ($E'^\circ = 0{,}03$), $NAD^+/NADH$ e o $FAD/FADH_2$ da succinato desidrogenase.

4. O grau de redução dos transportadores de elétrons na cadeia respiratória. O grau de redução de cada transportador de elétrons na cadeia respiratória é determinado pelas condições existentes na mitocôndria. Por exemplo, quando o NADH e O_2 forem abundantes, o grau de redução de estado estacionário dos transportadores diminui à medida que os elétrons passam do substrato para o O_2. Quando a transferência de elétrons é bloqueada, os transportadores antes do bloqueio tornam-se mais reduzidos enquanto aqueles além do bloqueio tornam-se mais oxidados (veja Fig. 19-6). Para cada uma das condições abaixo, preveja o estado de oxidação da ubiquinona e dos citocromos b, c_1, c e $a + a_3$.

(a) NADH e O_2 abundantes, mas na presença de cianeto.

(b) NADH abundante, mas com falta de O_2.

(c) O_2 abundante, mas com falta de NADH.

(d) NADH e O_2 abundantes.

5. Efeito da rotenona e da antimicina A na transferência de elétrons. A rotenona, um produto natural tóxico de plantas, inibe fortemente a NADH desidrogenase mitocondrial de insetos e peixes. A antimicina A, um antibiótico tóxico, inibe fortemente a oxidação do ubiquinol.

(a) Explique por que a ingestão de rotenona é letal para algumas espécies de insetos e peixes.

(b) Explique por que a antimicina A é um veneno.

(c) Assumindo que a rotenona e a antimicina A são igualmente efetivas no bloqueio dos seus respectivos sítios na cadeia de transferência de elétrons, qual seria o veneno mais potente? Explique.

6. Desacopladores da fosforilação oxidativa. Na mitocôndria normal a velocidade da transferência de elétrons é fortemente acoplada à demanda de ATP. Quando a velocidade de utilização do ATP for relativamente baixa, a velocidade da transferência de elétrons é baixa. Quando a demanda de ATP aumenta, a velocidade de transferência de elétrons também aumenta. Nessas condições de forte acoplamento, o número de moléculas de ATP produzidas por átomo de oxigênio consumido, quando o NADH é o doador de elétrons — o quociente P/O — é cerca de 2,5.

(a) Preveja os efeitos de uma concentração relativamente baixa e outra relativamente alta de um agente desacoplador na velocidade da transferência de elétrons e no quociente P/O.

(b) A ingestão dos desacopladores provoca profunda sudorese e um aumento na temperatura corporal. Explique esse fenômeno em termos moleculares. O que acontece com o quociente P/O na presença dos desacopladores?

c) O desacoplador 2,4-dinitrofenol certa vez foi prescrito como droga redutora do peso corporal. Em princípio, como essa droga poderia funcionar na ajuda da redução do peso corporal? Tais agentes desacopladores não são mais prescritos devido a algumas mortes ocorridas após o seu uso. Como a ingestão de desacopladores pode levar à morte?

7. Efeitos da valinomicina na fosforilação oxidativa. Quando o antibiótico valinomicina é adicionado a uma suspensão de mitocôndrias que respiram ativamente, vários fatores acontecem: o rendimento de ATP diminui, a velocidade de consumo de O_2 aumenta, o calor é liberado e o gradiente de pH através da membrana mitocondrial interna aumenta. A valinomicina atua como um desacoplador ou um inibidor da fosforilação oxidativa? Explique as observações experimentais em termos de a capacidade do antibiótico transferir íons K^+ através da membrana interna da mitocôndria.

8. Modo de ação da diciclo-hexilcarbodiimida (DCCD). Quando a DCCD é adicionada a uma suspensão de mitocôndrias fortemente acopladas e que respiram ativamente, a velocidade da transferência de elétrons (medida pelo consumo do O_2) e a velocidade da produção de ATP diminuem drasticamente. Se uma solução de 2,4-dinitrofenol é adicionada à preparação mitocondrial inibida, o consumo de O_2 retorna ao normal mas a produção de ATP permanece inibida.

(a) Que processo na transferência de elétrons ou na fosforilação oxidativa é afetado pela DCCD?

(b) Por que a DCCD afeta o consumo de O_2 da mitocôndria? Explique o efeito do 2,4-dinitrofenol na preparação mitocondrial inibida.

(c) Com quais dos seguintes inibidores a DCCD mais se assemelha na ação: antimicina A, rotenona ou oligomicina?

9. Compartimentação dos componentes do ciclo do ácido cítrico. A isocitrato desidrogenase é encontrada somente na mitocôndria, mas a malato desidrogenase é encontrada tanto no citosol como na mitocôndria. Qual é o papel da malato desidrogenase citosólica?

10. O sistema de transporte malato-α-cetoglutarato. O transporte de malato e α-cetoglutarato através da membrana interna da mitocôndria (Fig. 19-26) é inibido pelo n-butilmalonato. Suponha que o n-butilmalonato seja adicionado a uma suspensão aeróbica de células renais que usam a glicose como combustível exclusivo. Preveja o efeito desse inibidor: (a) na glicólise; (b) no consumo de oxigênio; (c) na formação do lactato; (d) na síntese do ATP.

11. A concentração celular do ADP controla a formação do ATP. Embora o ADP e o P_i são requeridos para a síntese do ATP, a velocidade de síntese depende principalmente da concentração do ADP e não do P_i, por quê?

12. O efeito Pasteur. Quando O_2 é adicionado a uma suspensão aeróbica de células que consomem glicose em uma alta taxa, a velocidade de consumo da glicose declina dramaticamente à medida que o O_2 é consumido e o acúmulo de lactato cessa. Esse efeito, inicialmente observado por Louis Pasteur em 1860, é característico da maioria das células capazes de utilizar tanto o catabolismo aeróbico como o anaeróbico da glicose.

(a) Por que o acúmulo de lactato cessa após a adição de O_2?

(b) Por que a presença de O_2 diminui a velocidade do consumo da glicose?

(c) Como o início do consumo do O_2 diminui a velocidade do consumo da glicose? Explique em termos de enzimas específicas.

13. Mutantes de levedura com respiração deficiente e produção de etanol. Mutantes de levedura com respiração deficiente (p^-; "petites") podem ser produzidos por meio de progenitores selvagens pelo tratamento com agentes mutagênicos. Os mutantes perdem a citocromo oxidase, uma deficiência que afeta marcantemente seu comportamento metabólico. Um efeito extraordinário é que a fermentação não é suprimida pelo O_2, isto é, os mutantes perdem o efeito Pasteur (ver Problema 14). Algumas companhias estão muito interessadas em usar esses mutantes para fermentar cavacos de madeira em etanol para uso energético. Explique as vantagens de se usar esses mutantes em vez da levedura selvagem, na produção em larga escala de etanol. Por que a ausência da citocromo oxidase elimina a efeito Pasteur?

14. Quantos prótons em uma mitocôndria? A transferência de elétrons transloca prótons da matriz mitocondrial para o meio externo, estabelecendo um gradiente de pH por meio da membrana interna (lado externo mais ácido que o interno). A tendência dos prótons em difundir de volta para o interior da matriz é a força impulsora da síntese do ATP pela ATP sintase. Durante a fosforilação oxidativa por uma suspensão de mitocôndria em um meio de pH 7,4, o pH interno da matriz medido foi 7,7.

(a) Calcule a $[H^+]$ no meio externo e na matriz nessas condições.

(b) Qual é o relação da $[H^+]$ exterior/interior? Comente sobre a energia inerente nessa concentração. (Indicação: veja pág. 322, Eq. 12-3).

(c) Calcule o número de prótons em uma mitocôndria de fígado respirando, assumindo que o seu compartimento matricial interno é uma esfera de 1,5μm de diâmetro.

(d) Considerando esses dados você pensaria que o gradiente de pH sozinho seria suficiente para gerar o ATP?

(e) Se não, você pode sugerir como a energia necessária para a síntese do ATP se origina?

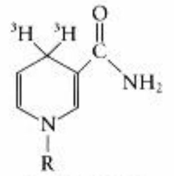
15. Velocidade da renovação do ATP no músculo cardíaco de rato. O músculo cardíaco de rato operando aerobicamente preenche mais de 90% das suas necessidades de ATP pela fosforilação oxidativa. Cada grama do tecido consome O_2 em uma velocidade de 10μmol/min, usando a glicose como fonte de energia.

(a) Calcule a velocidade com que o músculo cardíaco consome glicose e produz ATP.

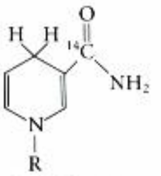
(b) Para uma concentração estacionária de ATP de 5μmol/g de tecido muscular cardíaco, calcule o tempo requerido (em segundos) para renovar completamente a concentração celular de ATP. O que esse resultado indica sobre a necessidade de uma forte regulação da produção de ATP? (Observe: concentrações são expressas em micromoles por grama de tecido muscular porque o tecido é constituído principalmente de água.)

16. Velocidade da degradação do ATP no músculo de voar. A produção de ATP nos músculos voadores do mosquito *Lucilia sericata* provém quase exclusivamente da fosforilação oxidativa. Durante o vôo, 187ml de O_2/h · g de peso corporal são necessários para manter uma concentração de ATP em 7μmol/g do músculo de voar. Assumindo que o músculo de voar representa 20% do peso do mosquito, calcule a velocidade na qual o ATP desse músculo se renova. Quanto tempo duraria o reservatório do ATP na ausência da fosforilação oxidativa? Assuma que os equivalentes redutores são transferidos pela lançadeira do glicerol-3-fosfato e que o O_2 esteja a 25°C e 101,3kPa (1atm). (Observe: as concentrações são expressas em micromoles por grama de músculo de voar.)

17. Movimentação transmembrana dos equivalentes redutores. Em condições aeróbicas, o NADH extramitocondrial deve ser oxidado pela cadeia de transferência de elétrons mitocondrial. Considere uma preparação de hepatócitos de ratos, contendo mitocôndria e todas as enzimas do citosol. Se o [4-^{3}H]NADH for adicionado, a radioatividade aparece rapidamente na matriz mitocondrial. Entretanto, se o [7-^{14}C]NADH for adicionado, nenhuma radioatividade aparece na matriz. O que essas observações revelam sobre a oxidação do NADH extramitocondrial pela cadeia de transferência de elétrons?



[4-^{3}H]NADH



[7-^{14}C]NADH

18. Reservatórios de NAD e atividades desidrogenases. Embora a piruvato desidrogenase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase usem NAD$^+$ como aceptor de elétrons, as duas enzimas não competem pelo mesmo reservatório celular de NAD. Por quê?

19. Eficiência fotoquímica da luz em diferentes comprimentos de onda. A velocidade da fotossíntese, medida pela produção de O_2, é maior quando uma planta verde é iluminada com luz de comprimento de onda de 680nm que com a luz de 700nm. Entretanto, a iluminação com uma combinação de luz de 680nm e 700nm resulta em uma velocidade de fotossíntese maior que a obtida com a luz de um dos comprimentos de onda isoladamente. Explique.

20. Balanço de massa para a fotossíntese. Em 1804, Theodore de Saussure observou que a massa total de oxigênio e de matéria orgânica seca produzida pelas plantas é maior que a massa de dióxido de carbono consumida durante a fotossíntese. De onde provém essa massa extra?

21. Papel do H_2S em algumas bactérias fotossintetizadoras. Quando iluminada, a bactéria sulfurosa púrpura desenvolve a fotossíntese na presença de H_2O e $^{14}CO_2$, mas apenas se o H_2S for adicionado e o O_2 estiver ausente. Durante a fotossíntese, medida pela formação do [^{14}C] carboidrato, o H_2S é convertido em enxofre elementar, mas nenhum O_2 é produzido. Qual é o papel da conversão do H_2S em enxofre? Por que o O_2 não é produzido?

22. Reforçando o poder redutor do fotossistema I pela absorção de luz. Quando o fotossistema I absorve a luz vermelha em 700nm, o potencial de redução padrão do P700 muda de 0,4 para cerca de −1,2V. Que fração da luz absorvida é captada na forma de poder redutor?

23. Síntese limitada de ATP no escuro. Os cloroplastos do espinafre são iluminados na ausência de ADP e P$_i$. Em seguida a luz é desligada e ADP e P$_i$ são adicionados. Nessas condições, o ATP é sintetizado durante um curto intervalo de tempo no escuro. Explique esse resultado.

24. Modo de ação do herbicida DCMU. Quando os cloroplastos são tratados com o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia (DCMU ou Diuron), um potente herbicida, a produção de O_2 e a fotofosforilação cessam. A produção de oxigênio, mas não a fotofosforilação, pode ser restaurada pela adição de um aceptor de elétrons externo, ou reagente de Hill. Como o DCMU age como matador de erva daninha? Sugira uma localização para a ação inibitória desse herbicida no esquema mostrado na Figura 19-46. Explique.

25. Bioenergética da fotofosforilação. As concentrações de estado estacionário do ATP, ADP e P_i nos cloroplastos isolados de espinafre, sob iluminação total em pH 7,0, são 120, 6 e 700µm, respectivamente.

(a) Qual é energia livre requerida para a síntese de 1 mol de ATP nessas condições?

(b) A energia para a síntese de ATP é fornecida pela transferência dos elétrons induzidos pela luz nos cloroplastos. Qual é a queda mínima de voltagem necessária (durante a transferência de um par de elétrons) para sintetizar ATP nessas condições? (Você pode precisar reportar à pág. 401, Eq. 14-6.)

26. Energia luminosa para uma reação redox. Suponha que você isolou um novo microrganismo fotossintetizador que oxida H_2S e transfere os elétrons para o NAD^+. Que comprimento de onda da luz garantirá energia suficiente para o H_2S reduzir o NAD^+ em condições padrões? Considere que a eficiência do evento fotoquímico é 100% e use E'° de –230mV para o H_2S e –320mV para o NAD^+. Veja a **Figura 19-36** para os equivalentes de energia dos comprimentos de onda da luz.

27. Constante de equilíbrio para as reações de cisão da água. A coenzima $NADP^+$ é o aceptor terminal de elétrons nos cloroplastos, de acordo com a reação

$$2H_2O + 2NADP^+ \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Use a informação na Tabela 19-2 para calcular a constante de equilíbrio a 25°C para esta reação (a relação entre K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$ foi descrita na pág. 384). Como o cloroplasto contorna esse equilíbrio desfavorável?

28. Energética da fototransdução. Durante a fotossíntese, oito fótons devem ser absorvidos (quatro em cada fotossistema) para cada molécula de O_2 produzida:

$$2H_2O + 2NADP^+ + 8\ \text{fótons} \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Assumindo que esses fótons apresentam um comprimento de onda de 700nm (vermelho) e que a absorção e a utilização da energia luminosa tenham uma eficiência de 100%, calcule a variação de energia livre para o processo.

29. Transferência de elétrons para o reagente de Hill. Os cloroplastos isolados de espinafre produzem O_2 quando iluminados na presença de ferricianeto de potássio (reagente de Hill), de acordo com a equação

$$2H_2O + 4Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + 4H^+ + 4Fe^{2+}$$

onde o Fe^{3+} representa o ferricianeto, e o Fe^{2+}, o ferrocianeto. O NADPH é produzido nesse processo? Explique.

30. Quão freqüentemente uma molécula de clorofila absorve um fóton? A quantidade de clorofila *a* (M_r 892) em uma folha de espinafre é cerca de 20µg/cm² de folha. Na luz solar do meio-dia (energia média de 5,4J/cm² · min), a folha absorve cerca de 50% da radiação. Quão freqüentemente uma única molécula de clorofila absorve um fóton? Se a vida média de uma molécula de clorofila excitada *in vivo* é de 1ns, que fração das moléculas de clorofila é excitada em qualquer tempo?

31. Efeito da luz monocromática no fluxo de elétrons. A extensão que um transportador de elétrons é oxidado ou reduzido durante a transferência de elétrons fotossintetizadores pode ser observada diretamente com um espectrofotômetro. Quando cloroplastos são iluminados com luz de 700nm, o citocromo *f*, a plastocianina e a plastoquinona são oxidados. Entretanto, quando os cloroplastos são iluminados com luz de 680nm, esses transportadores de elétrons são reduzidos. Explique.

32. Função da fotofosforilação cíclica. Quando o quociente $[NADPH]/[NADP^+]$ nos cloroplastos é alto, a fotofosforilação é predominantemente cíclica (veja Fig. 19-46). O O_2 é produzido durante a fotofosforilação cíclica? Explique. O NADPH é produzido? Explique. Qual é a principal função da fotofosforilação cíclica?

CAPÍTULO 20

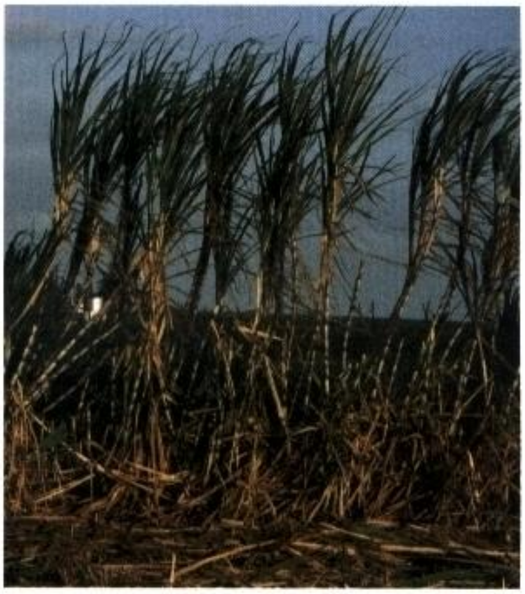
Biossíntese dos Carboidratos

No estudo do metabolismo celular chegamos agora ao que podemos chamar de um ponto de retorno. Nos capítulos precedentes da Parte III descrevemos como as principais substâncias alimentares — carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos — são degradadas, por meio de vias *catabólicas* convergentes, para entrar no ciclo do ácido cítrico e ceder seus elétrons para a cadeia respiratória. O fluxo exergônico de elétrons até o oxigênio está acoplado à síntese endergônica do ATP. Vamos estudar agora as vias *anabólicas* que usam a energia química na forma de ATP ou NADH ou NADPH para sintetizar os componentes celulares a partir de moléculas precursoras simples. As vias anabólicas são, em geral, redutoras antes que oxidativas. O catabolismo e o anabolismo ocorrem simultaneamente em um estado estacionário dinâmico, de tal forma que a liberação de energia por meio da degradação de componentes celulares é contrabalançada pelos processos biossintéticos que recriam e mantêm o ordenamento intrincado das células vivas.

Vários princípios de organização da biossíntese merecem ser enfatizados de início. O primeiro princípio é o de que a via metabólica para a síntese de uma biomolécula é usualmente diferente da via empregada para a sua degradação. Embora essas duas vias opostas (anabólica e catabólica) possam compartilhar muitas reações reversíveis, sempre há, ao menos, um passo enzimático que é exclusivo de cada uma. Se as reações do catabolismo e do anabolismo fossem catalisadas pelo mesmo conjunto de enzimas atuando reversivelmente, o fluxo de carbono por meio dessas vias seria ditado exclusivamente pelas leis de ação das massas (págs. 384, 386), não pelas sempre cambiantes necessidades celulares por energia, precursores metabólicos e macromoléculas.

Segundo princípio, as vias anabólicas e catabólicas correlacionadas são controladas pela regulação de uma ou mais das reações diferentes e exclusivas de cada uma das vias. Assim, as vias oponentes são reguladas de maneira coordenada e recíproca, de tal forma que a estimulação de uma via biossintética é acompanhada pela inibição da via degradativa correspondente e vice-versa. Como todas as vias complexas, as biossintéticas são usualmente reguladas nos seus passos iniciais, assim a célula evita o desperdício de precursores na confecção de intermediários que não são necessários em um dado momento; a economia intrínseca prevalece na lógica molecular das células vivas.

Terceiro, os processos biossintéticos que consomem energia estão acoplados à quebra do ATP, de tal forma que, globalmente, eles são essencialmente irreversíveis *in vivo*. Assim, a quantidade total de energia do ATP (e do NAD(P)H) empregada em uma dada via biossintética sempre excede a quantidade mínima de energia livre necessária para converter o precursor em seu produto biossintético. A variação de energia livre grande e negativa resultante para o processo global assegura que esse ocorrerá, mesmo quando as concentrações de precursores são relativamente baixas.



A cana-de-açúcar realiza a fotossíntese, nela a luz solar fornece energia para a redução do CO_2 em carboidratos que são armazenados como sacarose. A produção de carboidratos por fotossíntese fornece substratos reduzidos para outros organismos que os utilizam como combustível.

Este capítulo fornece muitas oportunidades para a comprovação dos três princípios resumidos anteriormente à medida que descrevermos as vias biossintéticas dos carboidratos. Ele está dividido em quatro partes. Estudaremos primeiro a gliconeogênese, a via para a síntese de glicose a partir de precursores simples. Descreveremos, então, como a glicose é convertida em uma grande variedade de dissacarídeos e polissacarídeos: glicogênio nos animais e em muitos dos microrganismos, amido e sacarose nos vegetais. Então, atingido este ponto, o foco de nossa atenção deslocar-se-á inteiramente para os vegetais. O terceiro tópico é a incorporação de CO_2 em moléculas mais complexas (assimilação do CO_2), um processo que representa a fonte última de compostos reduzidos de carbono para todos os organismos. O capítulo termina com o estudo da regulação do metabolismo dos carboidratos nos vegetais. A regulação global do metabolismo dos carboidratos nos mamíferos está compreendida em um estudo mais amplo sobre regulação hormonal no Capítulo 23.

Gliconeogênese

Iniciamos o estudo dos processos biossintéticos celulares com o estudo da via central que leva à formação de diferentes carboidratos partindo de precursores não-carboidratos (Fig. 20-1). A biossíntese da glicose é uma necessidade absoluta nos mamífe-

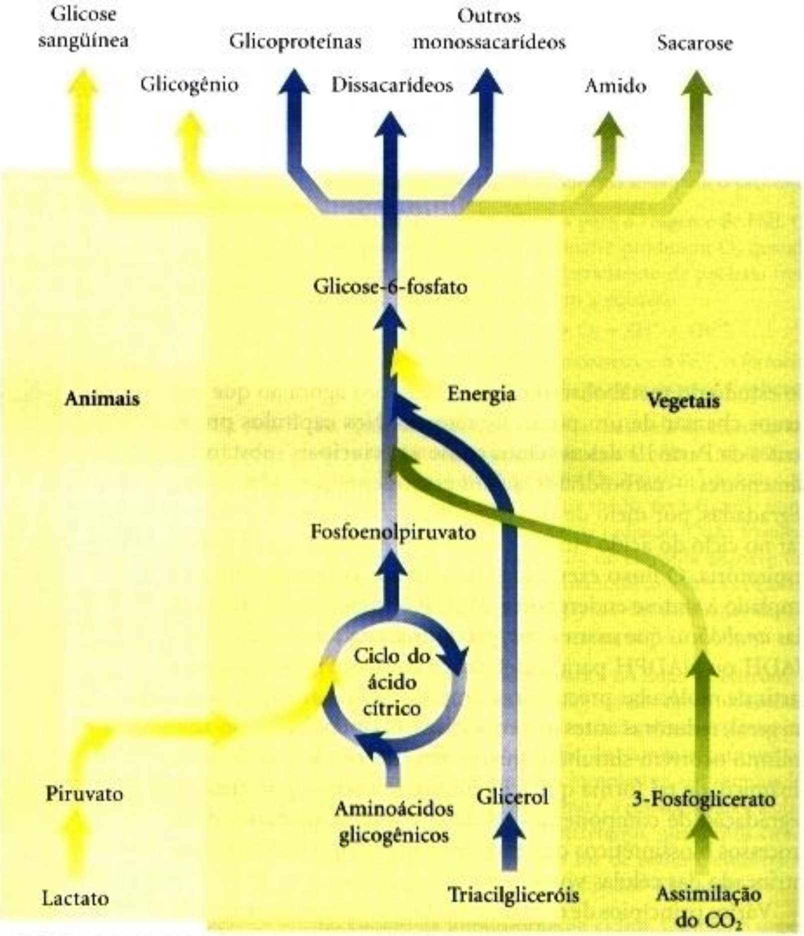


Figura 20-1 – Síntese de carboidratos a partir de precursores simples. Nos animais e também nos vegetais, a via do fosfoenolpiruvato até glicose-6-fosfato é comum na conversão biossintética de muitos precursores diferentes em carboidratos. Os vegetais e as bactérias são os únicos detentores da capacidade de converter CO_2 em carboidratos.

ros, porque o cérebro e o restante do sistema nervoso, bem como a medula renal, os testículos, os eritrócitos e os tecidos embrionários, necessitam da glicose fornecida por meio do sangue como sua principal, ou mesmo única, fonte de energia. O cérebro humano sozinho requer mais de 120g de glicose por dia.

A formação da glicose a partir de precursores diferentes das hexoses é chamada de **gliconeogênese** ("formação de açúcar novo"). A gliconeogênese é uma via universal encontrada em todos os animais, vegetais, fungos e microrganismos, e as reações que dela fazem parte são as mesmas em todos os casos. Os precursores importantes da glicose nos animais são o lactato, o piruvato, o glicerol e a maioria dos aminoácidos (Fig. 20-1). Nos animais superiores, a gliconeogênese ocorre principalmente no fígado e, em uma extensão muito menor, no córtex renal. Nas sementes em processo de germinação, as proteínas e as gorduras armazenadas são convertidas em sacarose, um dissacarídeo, para transporte através da planta em desenvolvimento. A glicose e seus derivados são precursores na síntese das paredes celulares vegetais, nucleotídeos e coenzimas e de uma grande variedade de outros metabólitos essenciais. Muitos microrganismos são capazes de crescer em compostos orgânicos simples como acetato, lactato e propionato, os quais podem ser convertidos em glicose por meio da gliconeogênese.

Embora as reações da gliconeogênese sejam as mesmas em todos os organismos vivos, o contexto metabólico e a regulação da via diferem de espécie para espécie e de tecido para tecido. Neste capítulo vamos estudar primeiro a gliconeogênese e a forma como ela ocorre no fígado dos mamíferos. Depois, será considerado seu papel e sua regulação nos vegetais.

Assim como a conversão glicolítica da glicose em piruvato é uma via central do catabolismo dos carboidratos, a conversão de piruvato em glicose é uma via central na gliconeogênese. Nos animais, as duas vias ocorrem principalmente no citosol e há necessidade de serem reguladas de forma recíproca e coordenada. Embora essas vias compartilhem vários passos intermediários, elas não são idênticas (Fig. 20-2); sete das 10 reações enzimáticas da gliconeogênese são, na realidade, inversões de reações da glicólise (discutida no Capítulo 15).

Entretanto, três passos na glicólise são essencialmente irreversíveis *in vivo* e não podem ser empregados na gliconeogênese: a conversão de glicose em glicose-6-fosfato pela hexoquinase, a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato por meio da fosfofrutoquinase-1 e, finalmente, a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato pela piruvato quinase (Fig. 20-2). Nas células, essas três reações são caracterizadas por uma variação de energia livre, ΔG, grande e negativa, enquanto as outras reações glicolíticas possuem um valor de ΔG próximo de zero (Tabela 20-1). Na gliconeogênese, esses três passos são contornados por um conjunto separado de enzimas que catalisa reações que são suficientemente exergônicas para ser efetivamente irreversíveis na direção da síntese da glicose. Assim, glicólise e gliconeogênese são processos irreversíveis nas células, regulados de forma independente por controles exercidos em passos enzimáticos específicos de cada uma das vias.

Iniciaremos estudando as três reações da gliconeogênese que contornam os passos irreversíveis da glicólise. (Tenha em mente que o verbo "contornar" será empregado aqui significando "contornar as reações irreversíveis da via glicolítica".)

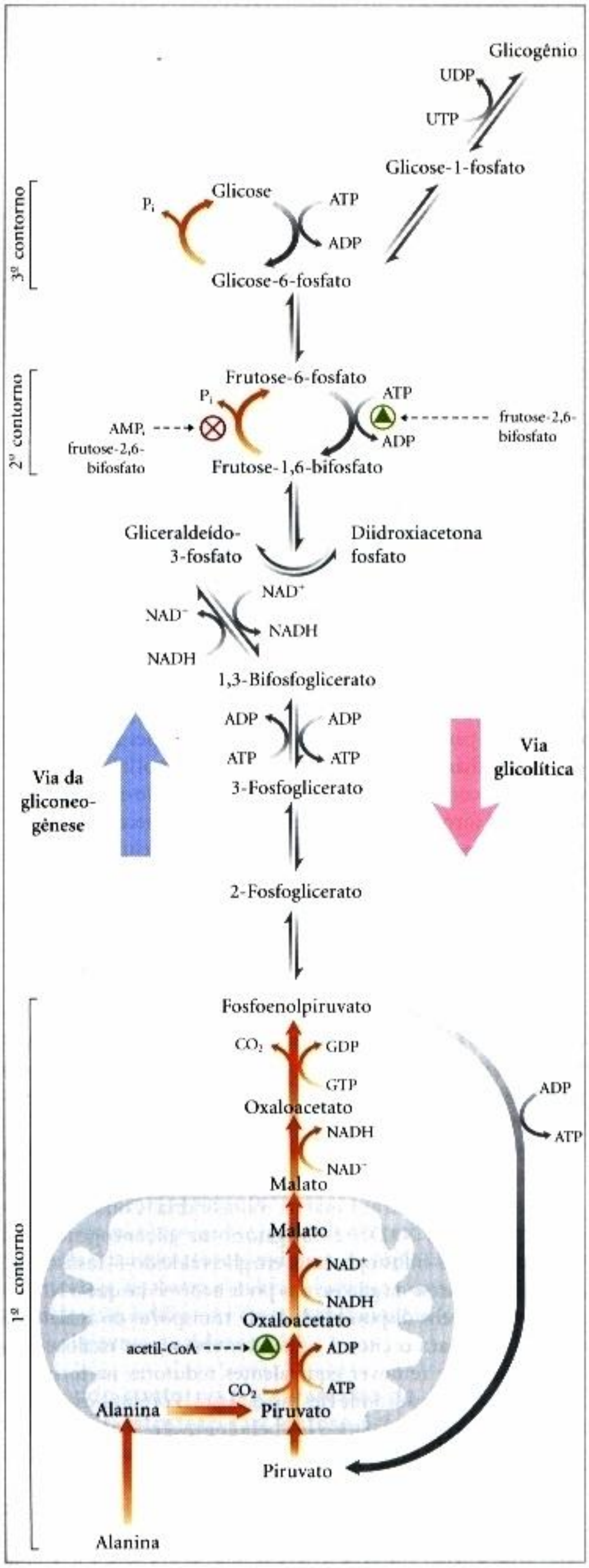

Glicogênio
UDP
UTP
Glicose-1-fosfato
3º contorno
Pᵢ
Glicose
ATP
ADP
Glicose-6-fosfato
2º contorno
Frutose-6-fosfato
Pᵢ
ATP
AMP,
frutose-2,6-bifosfato
ADP
frutose-2,6-bifosfato
Frutose-1,6-bifosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
Diidroxiacetona fosfato
NAD⁺
NAD⁺
NADH
NADH
1,3-Bifosfoglicerato
ADP
ADP
ATP
ATP
Via da gliconeo-gênese
Via glicolítica
3-Fosfoglicerato
2-Fosfoglicerato
1º contorno
Fosfoenolpiruvato
CO₂
GDP
GTP
Oxaloacetato
NADH
NAD⁺
Malato
ADP
ATP
Malato
NAD⁺
NADH
Oxaloacetato
acetil-CoA
ADP
CO₂
ATP
Alanina
Piruvato
Piruvato
Alanina

Figura 20-2 – As vias opostas da glicólise e da gliconeogênese no fígado do rato. As três reações da gliconeogênese que contornam os passos irreversíveis da glicólise estão em alaranjado. Os dois principais sítios de regulação da gliconeogênese estão também aqui representados; eles são descritos no texto mais adiante. Uma rota alternativa para o oxaloacetato produzido no interior da mitocôndria é mostrada na Figura 20-4.

A conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato necessita de duas reações exergônicas

A primeira das reações a serem contornadas na gliconeogênese é a conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato. Essa conversão não pode ocorrer por simples inversão da reação da piruvato quinase (pág. 417) pois ela tem uma variação de energia livre padrão grande e negativa e é irreversível sob as condições que existem no interior das células intactas (Tabela 20-1, passo ⑩). Assim, a fosforilação do piruvato é conseguida por uma seqüência de reações que, nos mamíferos e em alguns outros organismos, requer a participação de enzimas existentes tanto no citosol quanto no interior das mitocôndrias. Como veremos, a via mostrada na Figura 20-2, descrita com mais detalhes adiante, é uma das duas vias que levam o piruvato para o fosfoenolpiruvato; ela é a via predominante quando o piruvato ou a alanina é o precursor gliconeogênico. Uma segunda via, a ser descrita adiante predomina quando o lactato é o precursor gliconeogênico.

Em primeiro lugar, o piruvato é transportado do citosol para a mitocôndria, ou gerado no interior da mitocôndria por transaminação. Então, a **piruvato carboxilase**, uma enzima mitocondrial que requer a coenzima biotina, converte o piruvato em oxaloacetato (Fig. 20-3):

$$\text{Piruvato} + HCO_3^- + ATP \longrightarrow \text{oxaloacetato} + ADP + P_i \qquad (20\text{-}1)$$

A piruvato carboxilase é a primeira enzima reguladora na via gliconeogênica; o acetil-CoA é necessário como efetor alostérico positivo. Essa também é uma reação anaplerótica (pág. 453) e refaz a concentração dos intermediários do ciclo do ácido cítrico. O mecanismo de reação envolve a biotina e está descrito na Figura 16-14.

O oxaloacetato formado do piruvato é reversivelmente reduzido a malato pela **malato desidrogenase** mitocondrial e com o consumo de NADH:

$$\text{Oxaloacetato} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \text{L-malato} + NAD^+ \qquad (20\text{-}2)$$

Recorde do Capítulo 16 (pág. 450) que esta reação, julgada pelo seu $\Delta G'^{\circ}$, é fortemente exergônica. Entretanto, em condições fisiológicas, a reação tem um ΔG próximo de zero e, assim, é facilmente reversível. Dessa forma, a malato desidrogenase mitocondrial funciona em ambas as vias, gliconeogênese e ciclo do ácido cítrico, muito embora o fluxo de metabólitos seja oposto em cada uma delas.

A seguir, o malato abandona a mitocôndria por meio do transportador malato-α-cetoglutarato presente na membrana mitocondrial interna (veja Fig. 19-26). No citosol, o malato é reoxidado em oxaloacetato, com a produção de NADH citosólico:

$$\text{Malato} + NAD^+ \longrightarrow \text{oxaloacetato} + NADH + H^+ \qquad (20\text{-}3)$$

O oxaloacetato é então convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) pela **fosfoenolpiruvato carboxiquinase** por meio de uma reação dependente de Mg^{2+}, na qual o GTP funciona como fosfato doador (Fig. 20-3):

$$\text{Oxaloacetato} + GTP \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + CO_2 + GDP \qquad (20\text{-}4)$$

Esta reação é reversível em condições intracelulares; a formação de um composto com fosfato de alta energia (PEP) é contrabalançada pela hidrólise de outro equivalente (GTP).

A equação global para esse conjunto de reações de contorno é obtida pela soma das Equações 20-1 a 20-4:

$$\text{Piruvato} + ATP + GTP + HCO_3^- \longrightarrow \text{fosfoenolpiruvato} + ADP + GDP + P_i + CO_2 \qquad (20\text{-}5)$$

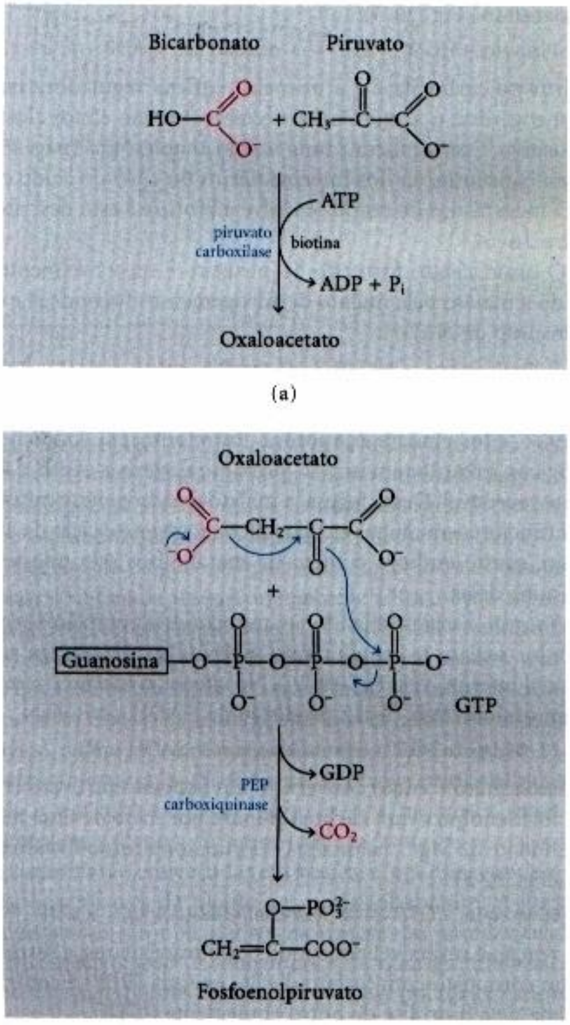
$$\Delta G'^{\circ} = 0{,}9\,\text{kJ/mol}$$

Assim, para fosforilar uma molécula de piruvato em fosfoenolpiruvato precisam ser consumidos dois grupos fosfato de alta energia (um do ATP e outro do GTP), cada um deles liberando

Tabela 20-1 – Variações da energia livre das reações glicolíticas nos eritrócitos*

Reação glicolítica	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
① Glicose + ATP $\longrightarrow$ glicose-6-fosfato + ADP + H^+	−16,7	−33,4
② Glicose-6-fosfato $\rightleftharpoons$ frutose-6-fosfato	1,7	−2,5
③ Frutose-6-fosfato + ATP $\longrightarrow$ frutose-1,6-bifosfato + ADP + H^+	−14,2	−22,2
④ Frutose-1,6-bifosfato $\rightleftharpoons$ diidroxiacetona fosfato + gliceraldeído-3-fosfato	23,8	−1,25
⑤ Diidroxiacetona fosfato $\rightleftharpoons$ gliceraldeído-3-fosfato	7,5	2,5
⑥ Gliceraldeído-3-fosfato + P_i + NAD^+ $\rightleftharpoons$ 1,3-bifosfoglicerato + NADH + H^+	6,3	−1,7
⑦ 1,3-Bifosfoglicerato + ADP $\rightleftharpoons$ 3-fosfoglicerato + ATP	−18,8	1,25
⑧ 3-Fosfoglicerato $\rightleftharpoons$ 2-fosfoglicerato	4,4	0,8
⑨ 2-Fosfoglicerato $\rightleftharpoons$ fosfoenolpiruvato + H_2O	7,5	−3,3
⑩ Fosfoenolpiruvato + ADP + H^+ $\longrightarrow$ piruvato + ATP	−31,4	−16,7

*$\Delta G'^{\circ}$ é variação da energia livre padrão, como definida no Capítulo 14 (veja pág. 384). Em pH 7,0, ΔG é a variação da energia livre calculada a partir das concentrações reais dos intermediários glicolíticos presentes em condições fisiológicas nos eritrócitos. As reações glicolíticas que são contornadas na gliconeogênese estão mostradas em vermelho.



(a)

(b)

Figura 20-3 – Síntese do fosfoenolpiruvato a partir do piruvato. (**a**) Na mitocôndria, o piruvato é convertido em oxaloacetato em uma reação que precisa de biotina e é catalisada pela piruvato carboxilase. (**b**) No citosol, o oxaloacetato é convertido em fosfoenolpiruvato pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase; o CO_2 que foi fixado na reação da piruvato carboxilase é perdido aqui. A descarboxilação leva a um rearranjo dos elétrons que facilita o ataque do oxigênio carbonila da porção piruvato pelo fosfato γ do GTP.

50kJ/mol sob condições celulares. Em contraste, quando o fosfoenolpiruvato é convertido em piruvato durante a glicólise, apenas um ATP é gerado de ADP. Embora a variação de energia livre padrão ($\Delta G'^{\circ}$) da reação líquida que conduz ao fosfoenolpiruvato seja 0,9kJ/mol, a variação real de energia livre (ΔG), calculada a partir das medidas das concentrações intracelulares de intermediários, é muito negativa (−25kJ/mol); isso é conseqüência do consumo rápido de fosfoenolpiruvato em outras reações, de tal forma que sua concentração permanece sempre relativamente pequena. Dessa forma, no interior celular a reação é irreversível.

Observe que o CO_2 perdido na reação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase é a mesma molécula que é adicionada ao piruvato no passo catalisado pela piruvato carboxilase (Fig. 20-3). Essa seqüência de carboxilação-descarboxilação representa uma forma de "ativar" o piruvato, uma vez que a descarboxilação do oxaloacetato facilita a formação do fosfoenolpiruvato. No Capítulo 21 veremos que, durante a biossíntese dos ácidos graxos, é utilizado um passo de carboxilação similar para ativar o acetil-CoA (Fig. 21-1).

Existe uma lógica na ocorrência dessas reações no interior da mitocôndria. A relação [NADH]/[NAD^+] no citosol é 8×10^{-4}, perto de 10^5 vezes menor que na mitocôndria. Como o consumo citosólico de NADH é obrigatório na gliconeogênese (na conversão de 1,3-bifosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato; Fig. 20-2), a biossíntese da glicose não pode ocorrer até que o NADH seja colocado em disponibilidade. O transporte do malato da mitocôndria para o citosol e sua conversão para oxaloacetato têm o efeito de remover equivalentes redutores na forma de NADH para o citosol, onde eles são escassos. Portanto, essa transformação do piruvato para o fosfoenolpiruvato fornece um importante equilíbrio entre a produção e o consumo de NADH no citosol durante a gliconeogênese.

Um segundo contorno piruvato → fosfoenolpiruvato, e também mais curto, predomina quando o lactato é o precursor gliconeogênico (Fig. 20-4). Essa via faz uso do lactato produzido pela glicólise nos eritrócitos ou nos músculos, por exemplo, e é particularmente importante nos grandes vertebrados depois de um exercício vigoroso (veja Adendo 15-1). A conversão do lactato em piruvato no citosol do hepatócito libera NADH e não é mais necessária a exportação do malato da mitocôndria para o citosol. Depois que o piruvato produzido pela reação da lactato

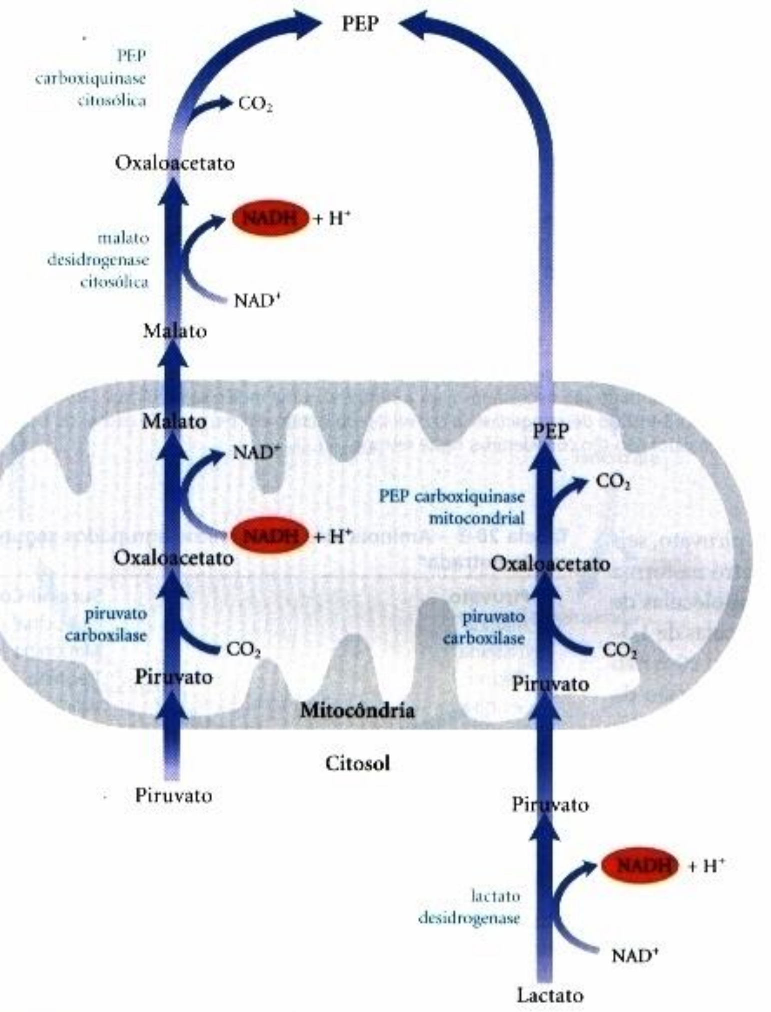


Figura 20-4 – Vias alternativas do piruvato ao fosfoenolpiruvato. A via que predomina depende do precursor glicogênico (lactato ou piruvato). A via à direita (menor por um passo que a via à esquerda) predomina quando o lactato é o precursor, isso porque a reação da lactato desidrogenase gera NADH citosólico e não tem de ser transportado para fora da mitocôndria (veja o texto). A importância relativa das duas vias depende da disponibilidade de lactato e das necessidades citosólicas de NADH na gliconeogênese.

desidrogenase é transportado para o interior da mitocôndria, ele é convertido em oxaloacetato pela piruvato carboxilase como descrito anteriormente. Esse oxaloacetato, entretanto, é convertido diretamente em fosfoenolpiruvato por uma forma mitocondrial da fosfoenolpiruvato carboxiquinase. O fosfoenolpiruvato é então transportado para fora da mitocôndria e continua na via gliconeogênica. As formas mitocondrial e citosólica da fosfoenolpiruvato carboxiquinase são codificadas por genes nucleares separados, fornecendo um exemplo de duas enzimas distintas que catalisam a mesma reação, porém com diferentes locais de ação e diferentes funções metabólicas (reveja a descrição das isozimas no Adendo 15-3).

O segundo contorno é a conversão de frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato

A segunda reação da via glicolítica que não pode participar do processo da gliconeogênese é a fosforilação da frutose-6-fosfato pela fosfofrutoquinase-1 (Tabela 20-1, passo ③). Como essa reação é muito exergônica, ela é irreversível nas células intactas e a geração de frutose-6-fosfato a partir de frutose-1,6-bifosfato (Fig. 20-2) é catalisada por uma enzima diferente: a **frutose-1,6-bifosfatase** dependente de Mg^{2+}, que promove a *hidrólise* irreversível do fosfato no C-1 (*não* ocorre a transferência do grupo fosforila para o ADP):

$$\text{Frutose-1,6-bifosfato} + H_2O \longrightarrow \text{frutose-6-fosfato} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -16{,}3\text{kJ/mol}$$

A conversão da glicose-6-fosfato em glicose livre é o terceiro contorno

O terceiro contorno é a reação final da gliconeogênese, a desfosforilação da glicose-6-fosfato para liberar glicose livre (Fig. 20-2). A reversão da reação da hexoquinase (veja pág. 413) requereria a transferência de um grupo fosforil da glicose-6-fosfato para o ADP, com formação de ATP, uma reação energeticamente desfavorável (Tabela 20-1, passo ①). A reação catalisada **pela glicose-6-fosfatase** não requer a síntese de ATP e é a hidrólise simples de um éster fosfórico:

$$\text{Glicose-6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glicose} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -13{,}8\text{kJ/mol}$$

Essa fosfatase dependente de Mg^{2+} é encontrada no lado luminal do retículo endoplasmático de hepatócitos e células renais. A glicose-6-fosfatase não está presente nos músculos ou no cérebro e a gliconeogênese não ocorre nesses tecidos. Em vez disso, a glicose produzida por gliconeogênese no fígado e no rim, ou ingerida na dieta, é liberada para o cérebro e para os músculos por meio da corrente sangüínea.

A gliconeogênese é energeticamente custosa

A soma das reações biossintéticas que levam do piruvato até a glicose sangüínea livre (Tabela 20-2) é:

$$\begin{aligned}&2\ \text{Piruvato} + 4\text{ATP} + 2\text{GTP} + 2\text{NADH} + 4H_2O \longrightarrow \\ &\qquad \text{glicose} + 4\text{ADP} + 2\text{GDP} + 6P_i + 2\text{NAD}^+ + 2H^+ \end{aligned} \qquad (20\text{-}6)$$

Tabela 20-2 – Reações seqüênciais na gliconeogênese a partir do piruvato*

Piruvato + HCO_3^- + ATP $\longrightarrow$ oxaloacetato + ADP + P_i + H^+	×2
Oxaloacetato + GTP $\rightleftharpoons$ fosfoenolpiruvato + CO_2 + GDP	×2
Fosfoenolpiruvato + H_2O $\rightleftharpoons$ 2-fosfoglicerato	×2
2-Fosfoglicerato $\rightleftharpoons$ 3-fosfoglicerato	×2
3-Fosfoglicerato + ATP $\rightleftharpoons$ 1,3-bifosfoglicerato + ADP + H^+	×2
1,3-Bifosfoglicerato + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$ gliceraldeído-3-fosfato + NAD^+ + P_i	×2
Gliceraldeído-3-fosfato $\rightleftharpoons$ diidroxiacetona fosfato	
Gliceraldeído-3-fosfato + diidroxiacetona fosfato $\rightleftharpoons$ frutose-1,6-bifosfato	
Frutose-1,6-bifosfato + H_2O $\longrightarrow$ frutose-6-fosfato + P_i	
Frutose-6-fosfato $\rightleftharpoons$ glicose-6-fosfato	
Glicose-6-fosfato + H_2O $\longrightarrow$ glicose + P_i	
Soma: 2 Piruvato + 4ATP + 2GTP + 2NADH + $4H_2O$ $\longrightarrow$ glicose + 4ADP + 2GDP + $6P_i$ + $2NAD^+$ + $2H^+$	

*As reações de contorno estão em vermelho; todas as outras reações são passos reversíveis da glicólise. Os números à direita indicam que a reação é para ser contada em dobro, uma vez que dois precursores com três átomos de carbono são necessários para a síntese de uma molécula de glicose. Note que as reações necessárias para repor o NADH consumido na reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (a conversão de lactato em piruvato no citosol ou o transporte de redutores equivalentes da mitocôndria para o citosol na forma de malato) não são consideradas neste resumo.

Para cada molécula de glicose formada a partir do piruvato, seis grupos fosfato de alta energia são consumidos, quatro na forma de ATP e dois na forma de GTP. Em adição, duas moléculas de NADH são necessárias para a redução de duas moléculas de 1,3-bifosfoglicerato. Pode-se ver claramente que a Equação 20-6 não representa a simples reversão da equação para a conversão da glicose em piruvato pela glicólise, que libera apenas duas moléculas de ATP:

$$\text{Glicose} + 2\text{ADP} + 2P_i + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2H^+ + 2H_2O$$

Dessa forma, a síntese da glicose a partir do piruvato é um processo relativamente custoso. A maior parte desse alto custo energético é necessária para assegurar que a gliconeogênese seja irreversível. Nas condições intracelulares, a variação global da energia livre da glicólise é pelo menos –63kJ/mol. Nessas mesmas condições, a variação global de energia livre da gliconeogênese é igual a –16kJ/mol. Assim, tanto a glicólise como a neoglicogênese são processos essencialmente irreversíveis nas condições intracelulares.

Tabela 20-3 – Aminoácidos glicogênicos agrupados segundo o local de entrada*

Piruvato
- Alanina
- Cisteína
- Glicina
- Serina
- Triptofano†

α-Cetoglutarato
- Arginina
- Glutamato
- Glutamina
- Histidina
- Prolina

Succinil-CoA
- Isoleucina†
- Metionina
- Treonina
- Valina

Fumarato
- Fenilalanina†
- Tirosina†

Oxaloacetato
- Asparagina
- Aspartato

*Estes aminoácidos são precursores da glicose sangüínea ou do glicogênio hepático, porque eles podem ser convertidos em piruvato ou intermediários do ciclo do ácido cítrico. Apenas a leucina e a lisina são totalmente incapazes de fornecer carbonos para a síntese da glicose.

†Estes aminoácidos também são cetogênicos (veja Fig. 18-19).

Os metabólitos intermediários do ciclo do ácido cítrico e muitos aminoácidos são glicogênicos

A via biossintética até a glicose, descrita anteriormente, permite a síntese líquida de glicose não apenas de piruvato, mas, também, dos intermediários do ciclo do ácido cítrico: citrato, isocitrato, α-cetoglutarato, succinato, succinil-CoA, fumarato e malato; todos podendo ser oxidados a oxaloacetato.

No Capítulo 18 mostramos que alguns ou todos os átomos de carbono de muitos aminoácidos derivados de proteínas são, em última instância, convertidos em piruvato ou certos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Tais aminoácidos podem, portanto, sofrer uma conversão real em glicose e são chamados de aminoácidos **glicogênicos** (Tabela 20-3). A alanina e a glutamina fazem contribuições especialmente importantes por serem as principais moléculas empregadas no transporte de grupos amino dos tecidos extra-hepáticos até o fígado. Depois da remoção dos grupos que contêm nitrogênio, o que ocorre na mitocôndria hepática, os esqueletos carbônicos remanescentes (piruvato e α-cetoglutarato, respectivamente) são rapidamente canalizados para a gliconeogênese.

Em contraste, não há, nos mamíferos, conversão real líquida de ácidos graxos de número par de átomos de carbono em glicose, porque tais ácidos graxos liberam apenas acetil-CoA na clivagem oxidativa e o acetil-CoA não pode ser empregado como um precursor da glicose pelos mamíferos. A reação da piruvato desidrogenase é irreversível conforme as condições intracelulares e nenhuma outra via existe pela qual o acetil-CoA possa ser convertido em piruvato. Para cada dois átomos de carbono do acetato que entram no ciclo do acido cítrico, dois carbonos são perdidos como CO_2 (Fig. 20-5); portanto, não pode haver conversão real líquida de acetato em oxaloacetato ou piruvato. O acetato pode ser convertido em oxaloacetato nos organismos que possuem o ciclo do glioxalato, uma via metabólica descrita no Capítulo 16 (veja Fig. 16-16) e que será revisitada mais tarde ainda neste capítulo, mas essa via está ausente nos animais. Entretanto, embora os ácidos graxos não possam fornecer átomos de carbono para gliconeogênese nos animais, sua oxidação fornece energia para o processo de síntese da glicose.

Os ciclos fúteis do metabolismo dos carboidratos consomem ATP

Em cada um dos três pontos onde as reações glicolíticas são contornadas por um tipo alternativo de reação enzimática da gliconeogênese, a operação simultânea das duas vias seria um desperdício. Por exemplo, a fosfofrutoquinase-1 e a frutose-1,6-bifosfatase catalisam reações opostas:

$$\text{ATP} + \text{frutose-6-fosfato} \longrightarrow \text{ADP} + \text{frutose-1,6-bifosfato}$$

$$\text{Frutose-1,6-bifosfato} + H_2O \longrightarrow \text{frutose-6-fosfato} + P_i$$

A soma destas duas reações é:

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i + \text{calor}$$

que é uma reação desperdiçadora de energia, resultando na hidrólise do ATP sem realizar qualquer trabalho metabólico. É claro

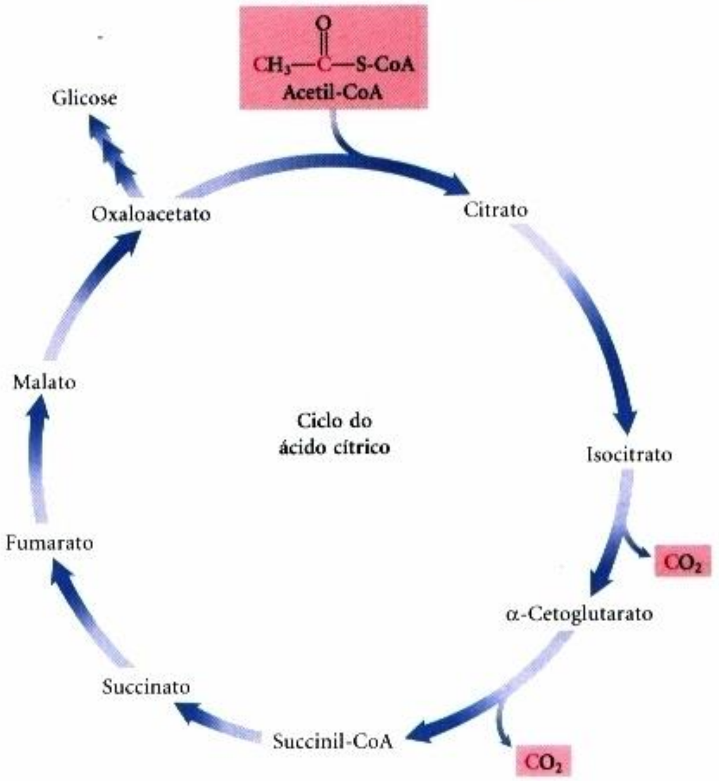


Figura 20-5 – Os ácidos graxos com número par de átomos de carbono na cadeia não podem ser fonte de carbono para a síntese líquida da glicose em animais e microrganismos. Os ácidos graxos são catabolizados até acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico, e, para cada dois carbonos que entram no ciclo como acetil-CoA, dois carbonos são perdidos como CO_2, dessa forma não há produção líquida de oxaloacetato para suportar a biossíntese da glicose por meio dessa via. Entretanto, a oxidação dos ácidos graxos fornece grandes quantidades de energia na forma de NADH, ATP e GTP (Capítulo 17) para a gliconeogênese. Os aminoácidos que são degradados até acetil-CoA são também não-glicogênicos (veja Fig. 18-29), pelas mesmas razões aqui ilustradas.

que, se for permitido às duas reações ocorrerem simultaneamente em alta velocidade e na mesma célula, uma grande quantidade de energia química será dissipada como calor. Um processo antieconômico como o descrito é chamado de **ciclo fútil**. Ciclos fúteis similares podem ocorrer nos outros dois conjuntos de reações que contornam as reações irreversíveis.

Em circunstâncias normais, os ciclos fúteis provavelmente não ocorrem com velocidade significativa, já que isso é evitado por mecanismos reguladores opostos e recíprocos (como exposto adiante). Entretanto, às vezes, ocorrem ciclos fúteis com a finalidade fisiológica de produzir calor. Por exemplo, durante o inverno, as vespas do tipo mangava não podem voar até que tenham aquecido os seus músculos a aproximadamente 30°C, com o calor gerado por hidrólise do ATP que ocorre durante o ciclo fútil constituído por frutose-6-fosfato e frutose-1,6-bifosfato.

A gliconeogênese e a glicólise são reguladas reciprocamente

Para assegurar que as necessidades metabólicas serão satisfeitas e que ciclos fúteis não ocorram em condições normais, a gliconeogênese e a glicólise são reguladas de maneira separada e recíproca. O primeiro ponto de controle determina o destino do piruvato na mitocôndria. O piruvato pode ser convertido quer em acetil-CoA (pelo complexo da piruvato desidrogenase, Capítulo 16) para fornecer combustível para o ciclo do ácido cítrico, quer em oxaloacetato (pela piruvato carboxilase) para iniciar o processo da gliconeogênese (Fig. 20-6). O acetil-CoA é um modulador alostérico positivo da piruvato carboxilase e um modulador negativo da piruvato desidrogenase por meio da estimulação de uma proteína quinase que inativa a desidrogenase. Quando as necessidades energéticas da célula estão sendo atendidas, a fosforilação oxidativa desacelera, o NADH se acumula e inibe o ciclo do ácido cítrico, o que provoca aumento da con-

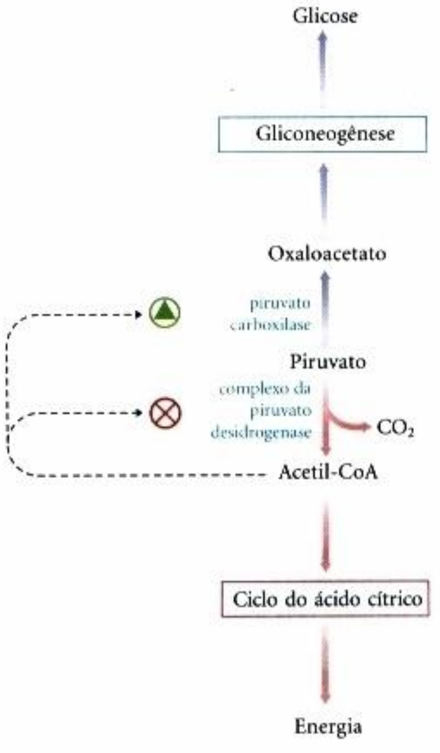


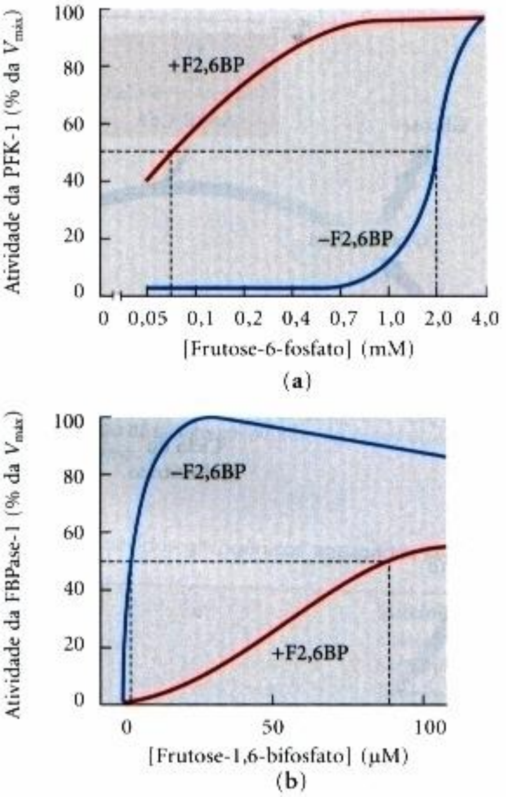
Figura 20-6 – O piruvato tem dois destinos alternativos. O piruvato pode ser convertido em glicose e glicogênio via gliconeogênese ou ser oxidado até acetil-CoA para a produção de energia. Em cada uma dessas vias, a primeira enzima é regulada alostericamente; o acetil-CoA estimula a atividade da piruvato carboxilase e inibe a atividade do complexo da piruvato desidrogenase.

centração do acetil-CoA. Essa concentração aumentada de acetil-CoA inibe o complexo da piruvato desidrogenase, diminuindo a formação do acetil-CoA proveniente do piruvato, e estimula a gliconeogênese por ativação da piruvato carboxilase. Isso permite que o excesso de piruvato seja convertido em glicose.

O segundo ponto de controle na gliconeogênese é a reação catalisada pela frutose-1,6-bifosfatase, que é fortemente inibida por AMP. A enzima glicolítica correspondente, a fosfofrutoquinase-1, é estimulada por AMP e ADP, mas inibida por citrato e ATP, de tal forma que esses passos opostos nas duas vias são regulados de maneira coordenada e recíproca. Quando estão presentes concentrações suficientes de acetil-CoA ou do produto da condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato (citrato), ou, ainda, quando uma alta proporção do adenilato da célula está na forma de ATP, a gliconeogênese é favorecida.

O papel especial do fígado na manutenção de um nível constante de glicose no sangue requer mecanismos reguladores adicionais para coordenar a produção e o consumo de glicose. Quando o nível de glicose sangüínea diminui, o hormônio **glucagon** alerta o fígado para produzir e liberar mais glicose. Uma fonte de glicose é o glicogênio armazenado no próprio fígado; a outra fonte é a gliconeogênese.

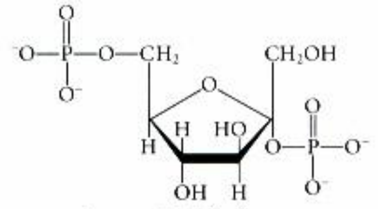
A regulação hormonal da glicólise e da gliconeogênese no fígado é mediada pela **frutose-2,6-bifosfato**, efetor alostérico para as enzimas fosfofrutoquinase-1 (PFK-1, veja Fig. 15-18) e frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) (Fig. 20-7). Quando a frutose-2,6-bifosfato une-se ao seu sítio alostérico na PFK-1, ela aumenta a afinidade dessa enzima pelo seu substrato frutose-6-fosfato e reduz sua afinidade pelos seus inibidores alostéricos, o ATP e o citrato. Portanto, a frutose-2,6-bifosfato ativa a PFK-1 e estimula a glicólise no fígado. Ao mesmo tempo, a frutose-2,6-bifosfato *inibe* a FBPase-1 e, dessa forma, desacelera a gliconeogênese.



(a)

(b)

Figura 20-7 – Papel da frutose-2,6-bifosfato na regulação da glicólise e gliconeogênese. A frutose-2,6-bifosfato tem efeitos opostos nas atividades enzimáticas da fosfofrutoquinase-1 (PFK-1, uma enzima glicolítica) e frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1, uma enzima da gliconeogênese). (**a**) A atividade da PFK-1 na ausência de frutose-2,6-bifosfato (curva azul) é metade da máxima quando a concentração do substrato, a frutose-6-fosfato, é 2mM (isto é $K_{0,5}$ = 2mM; lembre-se, do Capítulo 8, de que $K_{0,5}$ ou K_m são equivalentes à concentração do substrato nas quais ocorre a metade da atividade máxima da enzima). Quando está presente frutose-2,6-bifosfato 0,13μM (curva vermelha), o $K_{0,5}$ para frutose-6-fosfato é apenas 0,08mM. Assim a frutose-2,6-bifosfato ativa a PFK-1 por aumentar a sua afinidade aparente (veja pág. 202) pela frutose-6-fosfato. (**b**) A atividade da FBPase-1 é inibida por tão pouco quanto 1μM de frutose-2,6-bifosfato e é extremamente inibida por 25μM. Na ausência desse inibidor (curva azul), o $K_{0,5}$ para o substrato frutose-1,6-bifosfato é 5μM, mas na presença de 25μM de frutose-2,6-bifosfato (curva vermelha) o $K_{0,5}$ é >70μM. A frutose-2,6-bifosfato também torna essa enzima mais sensível à inibição por outro regulador alostérico, o AMP.



Frutose-2,6-bifosfato

Embora estruturalmente relacionada à frutose-1,6-bifosfato, a frutose-2,6-bifosfato claramente *não* é um intermediário na gliconeogênese ou na glicólise; ela é um *regulador*, cujo nível celular reflete o nível do hormônio glucagon no sangue, e esse nível aumenta quando a concentração de glicose diminui.

A concentração celular da frutose-2,6-bifosfato é regulada pelas velocidades relativas de sua síntese e de sua destruição (Fig. 20-8). A frutose-2,6-bifosfato é formada pela fosforilação da frutose-6-fosfato, catalisada pela fosfofrutoquinase-2 (PFK-2) e é destruída pela **frutose-2,6-bifosfatase** (FBPase-2). (Observe que essas enzimas são diferentes da PFK-1 e FBPase-1, que catalisam, respectivamente, a formação e a destruição da frutose-1,6-bifosfato.) PFK-2 e FBPase-2 são duas atividades de uma única proteína bifuncional. O equilíbrio dessas duas atividades no fígado, que determina o nível celular da frutose-2,6-bifosfato, é regulado pelo glucagon (Fig. 20-8). No Capítulo 13 (veja pág. 353), vimos que o glucagon estimula a adenilciclase por meio de uma proteína G. A adenilciclase produz 3',5'-AMP cíclico (cAMP) a partir do ATP e o cAMP estimula uma proteína quinase cAMP dependente: uma vez ativada, essa proteína quinase transfere um grupo fosforila do ATP para a proteína bifuncional PFK-2/FBPase-2. A fosforilação dessa proteína aumenta sua atividade FBPase-2 e inibe sua atividade de PFK-2. Portanto, o glucagon diminui o nível celular de frutose-2,6-bifosfato, inibindo a glicólise e estimulando a gliconeogênese. A produção aumentada de glicose habilita o fígado a responder ao glucagon fazendo o nível de glicose sangüínea voltar ao seu valor normal.

Nas sementes em germinação a gliconeogênese converte gorduras e proteínas em glicose

Muitas plantas armazenam lipídios e proteínas em suas sementes para ser empregados como fonte de energia e de precursores biossintéticos durante a germinação e antes que os mecanismos fotossintéticos possam supri-los. A gliconeogênese ativa ocorre nas sementes em germinação e fornece glicose não só para a síntese de sacarose (a forma de transporte do carbono nos vegetais) e de polissacarídeos, mas também para a de muitos outros metabólitos que são derivados das hexoses. Nos vegetais muito jovens (mudas e brotos vegetais), a sacarose fornece a maior parte da energia química necessária para o crescimento inicial.

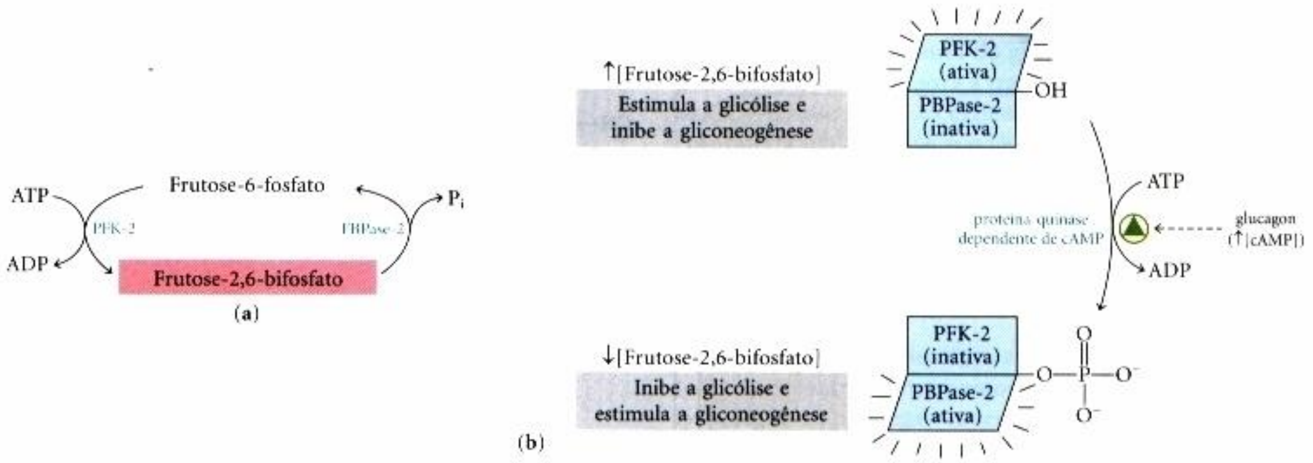


Figura 20-8 – Regulação da concentração da frutose-2,6-bifosfato. (**a**) A concentração celular do regulador frutose-2,6-bifosfato é determinada pelas velocidades de sua síntese pela fosfofrutoquinase-2 (PFK-2) e de sua quebra pela frutose-2,6-bifosfatase (FBPase-2). (**b**) Essas duas enzimas fazem parte da mesma cadeia polipeptídica e são reguladas de forma recíproca pelo glucagon. Aqui e em outros lugares as setas são empregadas para indicar aumento (↑) e diminuição (↓) dos níveis de metabólitos.

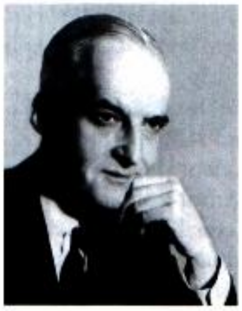
Diferentemente dos animais, os vegetais e alguns microrganismos podem converter em glicose o acetil-CoA derivado da oxidação das gorduras. Algumas das enzimas essenciais para essa conversão estão seqüestradas nos glioxissomos, organelas nas quais os ácidos graxos são oxidados a acetil-CoA pelas isozimas específicas da β-oxidação no glioxissomo (veja Fig. 16-18). A separação física das enzimas do ciclo do glioxalato e do processo de β-oxidação das enzimas do ciclo do ácido cítrico mitocondrial impede a oxidação do acetil-CoA até CO_2. Em lugar disso, o acetil-CoA é transformado em succinato no ciclo do glioxalato. O succinato passa para a matriz mitocondrial onde ele é convertido pelas enzimas do ciclo do ácido cítrico em oxaloacetato, que sai da mitocôndria para o citosol. O oxaloacetato citosólico é convertido pela gliconeogênese em frutose-6-fosfato, o precursor da sacarose. Assim, é necessária a integração das seqüências de reações que ocorrem em três compartimentos subcelulares para a produção de frutose-6-fosfato ou sacarose a partir de lipídios estocados. Como apenas três dos quatro carbonos em cada molécula de oxaloacetato são convertidos em hexose no citosol, perto de 75% do carbono presente nos lipídios armazenados nas sementes é convertido em carboidrato pelas vias combinadas mostradas na Figura 20-9. Os outros 25% são perdidos como CO_2 na conversão de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato. A hidrólise dos triacilgliceróis armazenados também produz o glicerol-3-fosfato, e este pode entrar na via gliconeogênica após sua oxidação a diidroxiacetona fosfato (Fig. 20-10).

Os aminoácidos glicogênicos (Tabela 20-3) obtidos da quebra das proteínas armazenadas nas sementes também liberam precursores da gliconeogênese. Após transaminação e oxidação até succinil-CoA, piruvato, oxaloacetato, fumarato e α-cetoglutarato (Capítulo 18) — todos eles excelentes materiais de partida para a gliconeogênese.

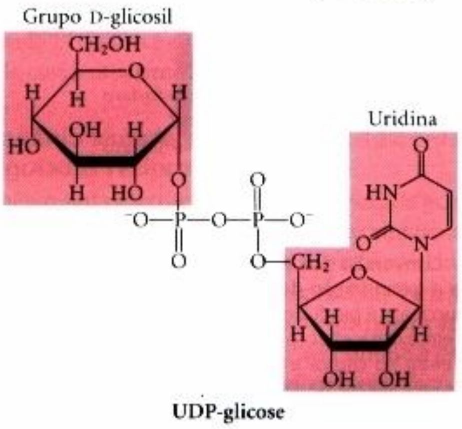
Biossíntese do Glicogênio, Amido, Sacarose e Outros Carboidratos

Em uma vasta gama de organismos, quando há glicose livre em excesso, ela é convertida em formas poliméricas para armazenamento e em dissacarídeos para transporte. Nos vertebrados e em muitos microrganismos, a principal forma de armazenamento da glicose é o glicogênio, enquanto o amido é o polissacarídeo de reserva característico dos vegetais. Nos vertebrados, é a própria glicose que é transportada no sangue, mas a forma de transporte nos vegetais é a sacarose e nos insetos é a trealose.

Muitas das reações nas quais as hexoses são transformadas ou polimerizadas envolvem os **nucleotídeos de açúcar**, compostos nos quais o carbono anomérico de um açúcar é ativado pela união a um nucleotídeo por meio de uma ligação fosfodiéster. Os nucleotídeos de açúcar são os substratos para a polimerização, quer em dissacarídeos, quer em glicogênio, amido, celulose e outros polissacarídeos extracelulares mais complexos. Eles são também intermediários importantes na produção das aminoexoses e desoxiexoses encontradas em alguns desses polissacarídeos e na síntese da vitamina C (ácido L-ascórbico); um nucleotídeo de açúcar é também essencial em algumas reações de detoxicação que ocorrem em vertebrados. O papel dos nucleotídeos de açúcar na biossíntese do glicogênio e de muitos outros carboidratos derivados foi descoberto pelo bioquímico argentino Luis Leloir, que identificou a função da **UDP-glicose**.



Luis Leloir
(1906-1988)



UDP-glicose

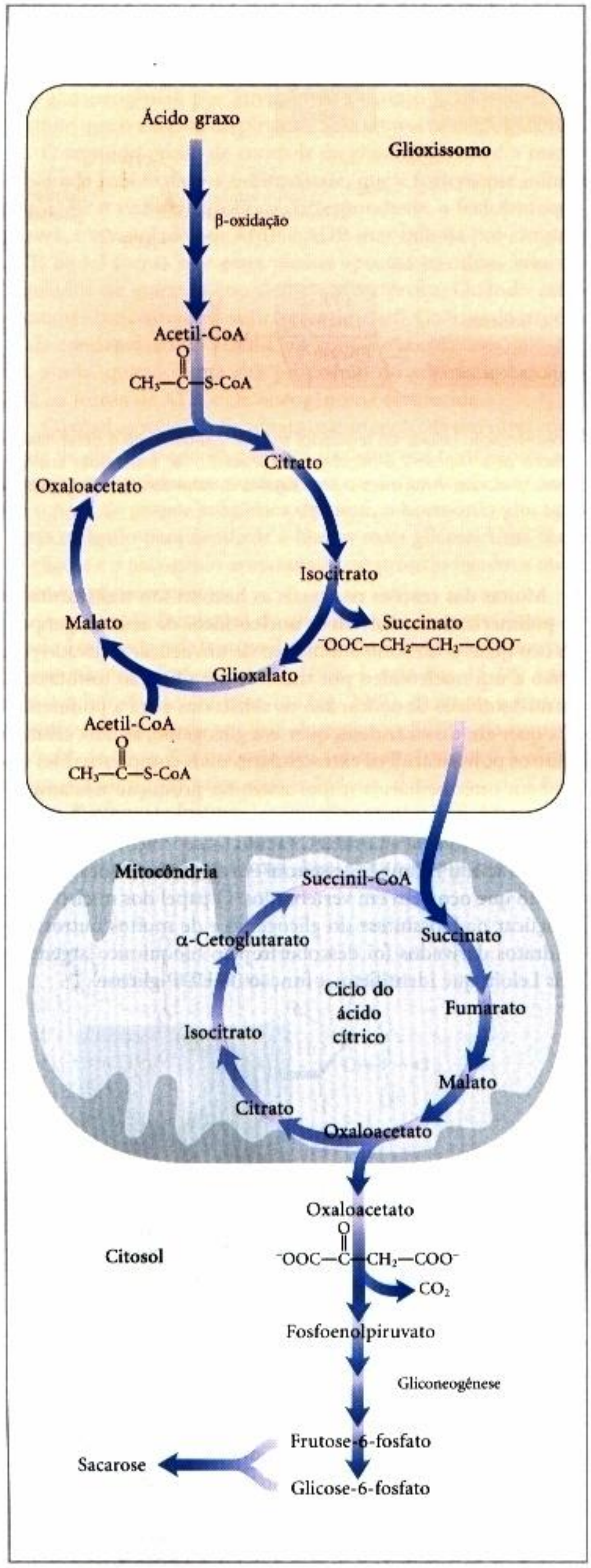

Ácido graxo
Glioxissomo
β-oxidação
Acetil-CoA
CH₃—C(=O)—S-CoA
Citrato
Oxaloacetato
Isocitrato
Malato
Succinato
⁻OOC—CH₂—CH₂—COO⁻
Glioxalato
Acetil-CoA
CH₃—C(=O)—S-CoA
Mitocôndria
Succinil-CoA
α-Cetoglutarato
Succinato
Ciclo do ácido cítrico
Fumarato
Isocitrato
Malato
Citrato
Oxaloacetato
Oxaloacetato
Citosol
⁻OOC—C(=O)—CH₂—COO⁻
CO₂
Fosfoenolpiruvato
Gliconeogênese
Frutose-6-fosfato
Sacarose
Glicose-6-fosfato

Figura 20-9 – Conversão dos ácidos graxos armazenados em sacarose durante a germinação das sementes. Esta via começa nos glioxissomos. O succinato é produzido e exportado para a mitocôndria, onde é convertido em oxaloacetato por enzimas do ciclo do ácido cítrico. O oxaloacetato entra no citosol e serve como material de partida para a gliconeogênese e a síntese da sacarose, esta é a forma de transporte do carbono nos vegetais.

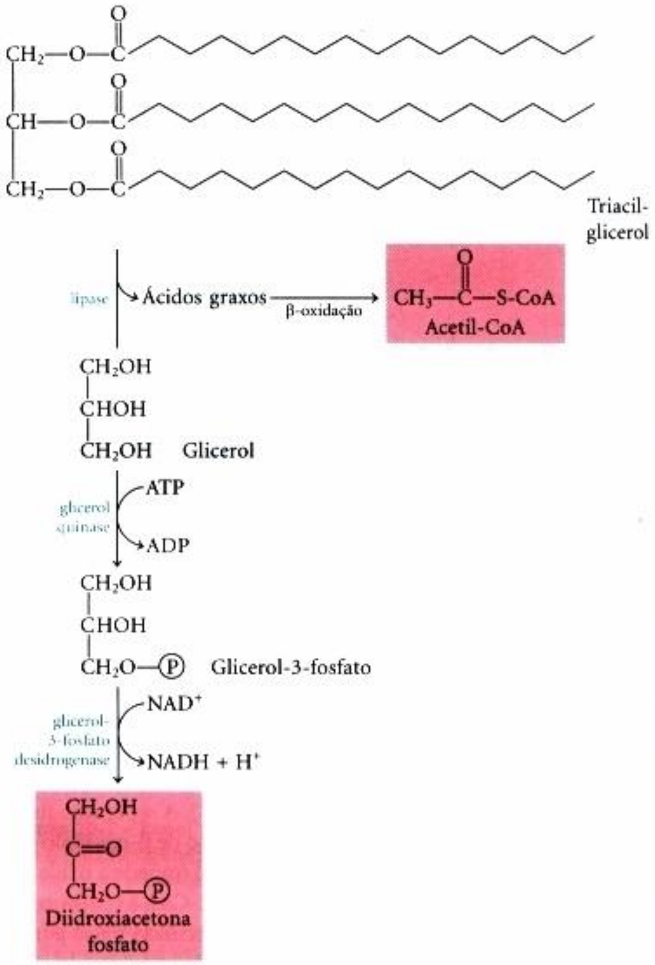
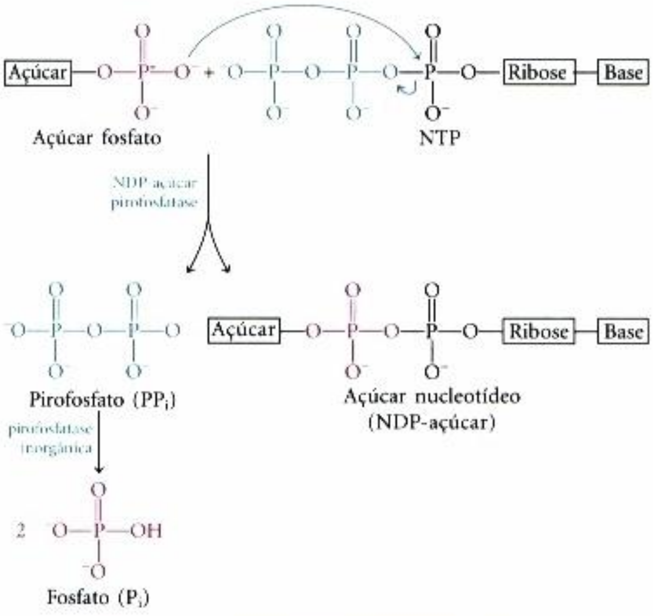

Triacil-glicerol
lipase
Ácidos graxos
β-oxidação
CH₃—C(=O)—S-CoA
Acetil-CoA
CH₂OH
CHOH
CH₂OH
Glicerol
glicerol quinase
ATP
ADP
CH₂OH
CHOH
CH₂O—Ⓟ
Glicerol-3-fosfato
glicerol-3-fosfato desidrogenase
NAD⁺
NADH + H⁺
CH₂OH
C=O
CH₂O—Ⓟ
Diidroxiacetona fosfato

Figura 20-10 – A conversão em sacarose da fração glicerol dos triacilgliceróis nas sementes em germinação. O glicerol dos triacilgliceróis é oxidado a diidroxiacetona fosfato que entra na via gliconeogênica na reação da triose fosfato isomerase.

A adequação dos nucleotídeos de açúcar para as reações de biossíntese deriva de várias propriedades:

1. A sua formação é metabolicamente irreversível, contribuindo para a irreversibilidade do processo biossintético do qual fazem parte como intermediários. A condensação de um nucleosídeo trifosfato com uma hexose-1-fosfato para formar um nucleotídeo de açúcar tem uma variação de energia livre próxima de zero no interior celular; ocorre, entretanto, que a reação produz PP_i que é hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica (Fig. 20-11). A grande e negativa variação da energia livre da hidrólise do PP_i potencia a reação sintética, uma estratégia freqüente e comum nas reações biológicas de polimerização.
2. Embora as transformações químicas dos nucleotídeos de açúcar não envolvam os átomos do nucleotídeo em si mesmo, a molécula de açúcar nucleotídeo oferece muitos grupos potenciais para interações não-covalentes com enzimas; a energia livre de ligação adicional contribui significativamente para a atividade catalítica da enzima (Capítulo 8; veja também pág. 274).
3. Como o fosfato, o grupo nucleotidil (UMP ou AMP) é um excelente grupo abandonador, ativando o carbono do açúcar ao qual ele está ligado, de forma a facilitar o ataque nucleofílico.
4. Por meio da "marcação" de algumas hexoses com grupos nucleotidil, as células podem separá-las para um dado propósito (síntese do glicogênio, por exemplo) de um conjunto das hexoses fosfato destinadas a outro propósito (como a glicólise).



Reação líquida: Açúcar fosfato + NTP ⟶ NDP-açúcar + $2P_i$

Figura 20-11 – Formação de um nucleotídeo de açúcar. Ocorre uma reação de condensação entre um nucleosídeo trifosfato (NTP) com um açúcar fosfato. O oxigênio carregado negativamente no açúcar fosfato atua como um nucleofílico, atacando o grupo fosfato α no nucleosídeo trifosfato e deslocando o pirofosfato. A reação é empurrada na direção direta pela hidrólise do PP_i pela pirofosfatase inorgânica.

O substrato para a síntese do glicogênio é a UDP-glicose

A síntese do glicogênio ocorre em virtualmente todos os tecidos animais, mas é especialmente proeminente no fígado e nos músculos esqueléticos. No fígado, o glicogênio funciona como um reservatório de glicose fácil de ser convertido em glicose sangüínea para a distribuição para outros tecidos, enquanto no músculo o glicogênio é quebrado por meio da glicólise para fornecer energia na forma de ATP para a contração muscular.

O ponto de início da síntese do glicogênio é a **glicose-6-fosfato**. Essa pode ser derivada da glicose livre pela ação da **glicoquinase** (no fígado) ou da **hexoquinase** (nos músculos):

$$\text{D-Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{D-glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

Entretanto, a maior parte da glicose ingerida durante uma refeição toma uma via mais longa para chegar até o glicogênio. Ela primeiro é captada pelos eritrócitos na corrente sangüínea e convertida glicoliticamente em lactato, o lactato é então captado pelo fígado e convertido em glicose-6-fosfato pelo processo gliconeogênico.

Para iniciar a síntese do glicogênio, a glicose-6-fosfato é convertida em **glicose-1-fosfato** pela **fosfoglicomutase**:

$$\text{Glicose-6-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose-1-fosfato}$$

A formação da UDP-glicose pela ação da **UDP-glicose pirofosforilase** é uma reação-chave na biossíntese do glicogênio:

$$\text{Glicose-1-fosfato} + \text{UTP} \longrightarrow \text{UDP-glicose} + PP_i$$

(Observe que essa enzima é nomeada considerando a reação inversa; lembre-se de nosso alerta no Adendo 16-1 a respeito de problemas de nomenclatura como este). Na célula a reação ocorre na direção da formação da UDP-glicose porque o pirofosfato é rapidamente hidrolisado em ortofosfato pela pirofosfatase inorgânica ($\Delta G'^{\circ} = -25$kJ/mol) (Fig. 20-11).

A UDP-glicose é o doador imediato de resíduos de glicose para a formação enzimática do glicogênio pela ação da **glicogênio sintase**, que promove a transferência do resíduo glicosil da UDP-glicose para uma extremidade não-redutora da molécula ramificada do glicogênio (Fig. 20-12). O equilíbrio global do conjunto de reações que vai da glicose-6-fosfato até o glicogênio aumentado de uma unidade favorece fortemente a síntese do glicogênio. A glicogênio sintase não é ativa sem um molde preexistente da cadeia de poliglicose com ligações ($\alpha1\rightarrow4$) ou, ao menos, um ramo mínimo contando com oito resíduos de glicose.

Como a glicogênio sintase não pode fazer as ligações ($\alpha1\rightarrow6$) encontradas nos pontos de ramificação do glicogênio (veja Fig. 9-15 para ligações semelhantes no amido), essas são formadas por uma enzima ramificadora do glicogênio, a **amilo (α1→4) a (α1→6) transglicosilase** ou **glicosil-(4→6)-transferase**. Esta enzima, glicosil-(4→6)-transferase, catalisa a transferência de um fragmento terminal de seis ou sete resíduos glicosil da extremidade não-redutora de uma ramificação do glicogênio que tem pelo menos 11 resíduos para o grupo hidroxila do C-6 de um resíduo de glicose nessa mesma cadeia, ou em outra cadeia da molécula do glicogênio e em um ponto mais para o interior, criando uma nova ramificação (Fig. 20-13). Isso feito, outros resíduos glicosil podem ser adicionados ao novo ramo pela glicogênio sintase. O efeito biológico da ramificação é deixar a molécula do glicogênio mais solúvel e aumentar o número de extremidades não-redutoras, o que torna o glicogênio mais acessível às enzimas glicogênio fosforilase e glicogênio sintase, já que ambas trabalham apenas com as extremidades não-redutoras.

Dado que a ação da glicogênio sintase necessita de um molde prévio inicial de glicogênio, como se principia uma nova molécula de glicogênio? A resposta está em uma intrigante proteína chamada **glicogenina** (M_r 37.284), que funciona como molde inicial ao qual o primeiro resíduo de glicose é ligado e, também, como catalisadora para a síntese de uma molécula nascente de glicogênio com até oito resíduos de glicose (Fig. 20-14). O primeiro passo é a ligação covalente de um resíduo de glicose ao resíduo tirosina^{194} da glicogenina, catalisada pela atividade de glicosil transferase da proteína (passo ①). A glicogenina forma então um complexo firme com a glicogênio sintase (passo ②), no interior do qual ocorrerão os próximos passos. A cadeia nascente é aumentada pela adição seqüencial de até mais sete resíduos de glicose (passo ③). Cada novo resíduo é fornecido pela UDP-glicose e as reações são autocatalíticas (mediadas pela atividade glicosil transferase da glicogenina). Nesse ponto, a glicogênio sintase assume seu papel catalítico, dissocia-se da glicogenina e continua a estender a cadeia do glicogênio (passo ④). A ação combinada da glicogênio sintase e da enzima de ramificação (passo ⑤) completa a estrutura de cada partícula de glicogênio. A glicogenina permanece enterrada dentro da partícula de glicogênio, a ela covalentemente ligada por uma das extremidades.

A glicogênio sintase e a glicogênio fosforilase são reguladas reciprocamente

A glicogênio sintase existe nas formas fosforilada e desfosforilada (Fig. 20-15). Sua forma ativa, a **glicogênio sintase *a***, é não-fosforilada. Quando ela é fosforilada em vários resíduos hidroxila de serinas por proteínas quinases específicas (veja Fig. 8-28), a glicogênio sintase *a* é convertida na forma menos ativa, **glicogênio sintase *b***. A conversão da glicogênio sintase *b* de volta à forma ativa é promovida por uma **fosfoproteína fosfatase** que remove os grupos fosfato dos resíduos de serina.

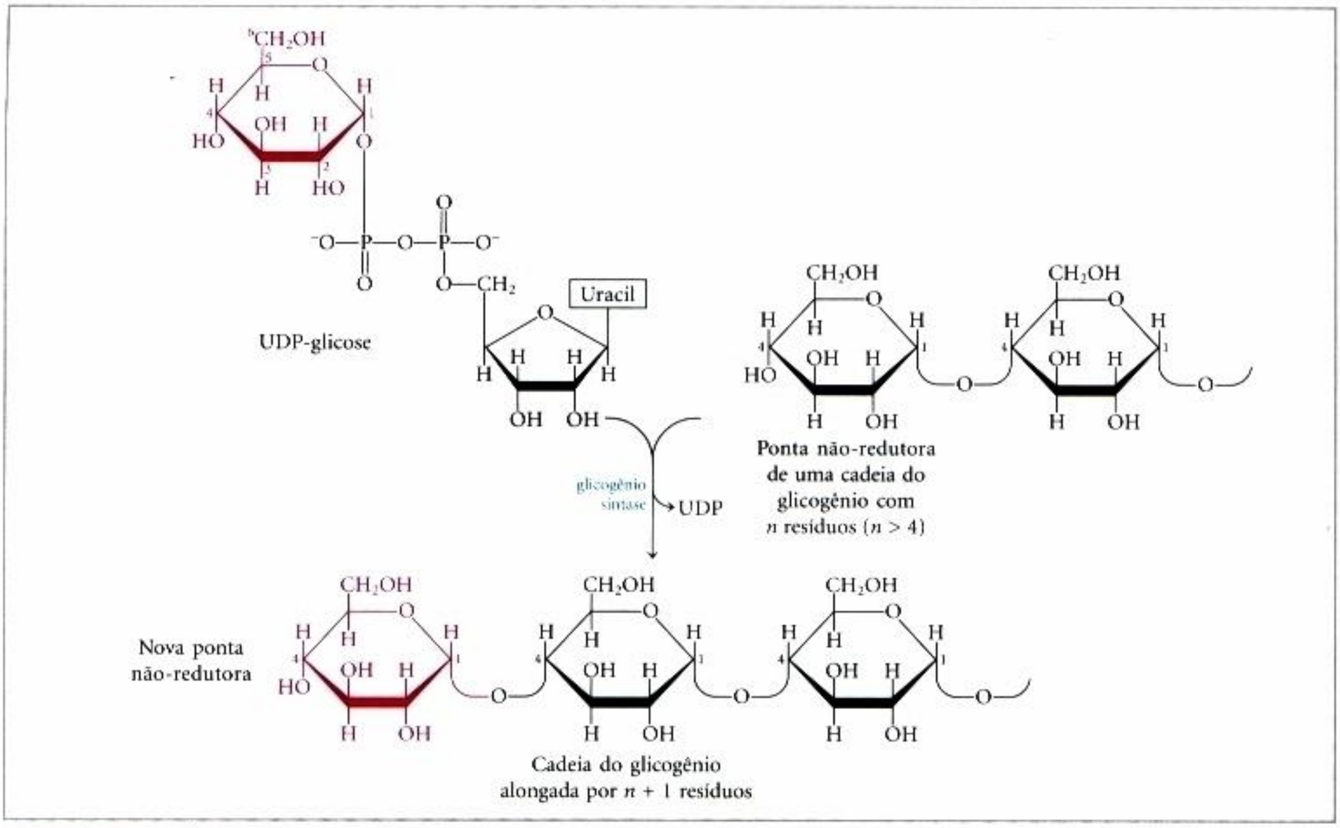

UDP-glicose
Uracil
glicogênio sintase
UDP
Ponta não-redutora de uma cadeia do glicogênio com n resíduos ($n > 4$)
Nova ponta não-redutora
Cadeia do glicogênio alongada por $n + 1$ resíduos

Figura 20-12 – Síntese do glicogênio. Alongamento de uma cadeia do glicogênio pela glicogênio sintase. O resíduo glicosil da UDP-glicose é transferido para a ponta não-redutora de uma ramificação do glicogênio (veja Fig. 9-15) para fazer uma nova ligação (α1→4).

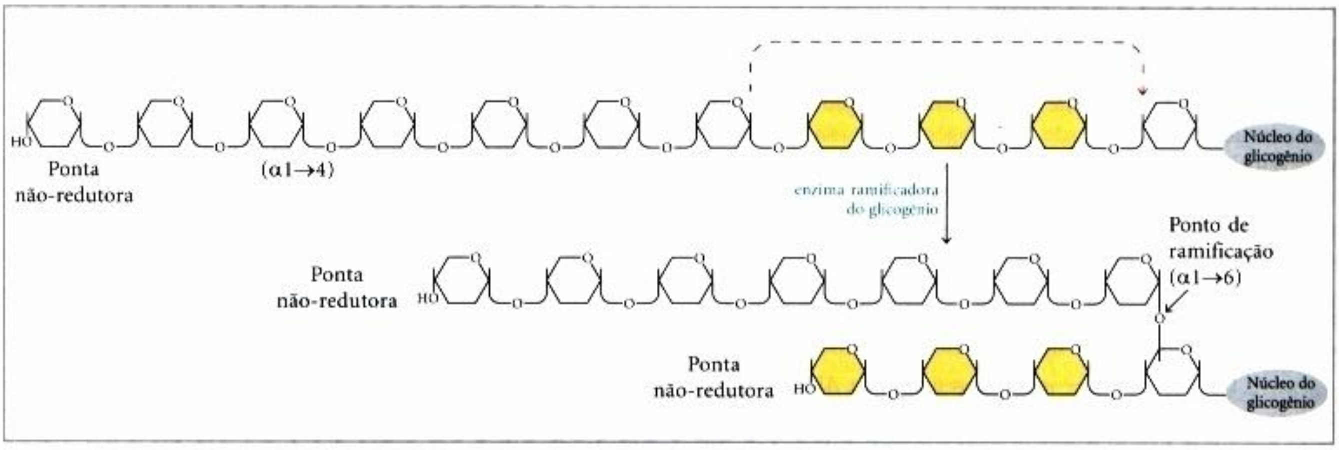

Ponta não-redutora
(α1→4)
Núcleo do glicogênio
enzima ramificadora do glicogênio
Ponto de ramificação (α1→6)
Ponta não-redutora
Ponta não-redutora
Núcleo do glicogênio

Figura 20-13 – Síntese de uma ramificação do glicogênio. A enzima ramificadora do glicogênio glicosil-(4→6)-transferase (também chamada amilo (1→4) a (1→6) transglicosilase) forma um novo ponto de ramificação durante a síntese do glicogênio.

Já foi visto que a quebra do glicogênio é regulada por meio da modulação alostérica e da modulação covalente da fosforilase do glicogênio (veja Fig. 15-19). A fosforilase *a*, a forma ativa, que é fosforilada no resíduo de serina número 14 (Ser^{14}) de suas duas subunidades, é desfosforilada pela fosforilase *a* fosfatase para liberar fosforilase *b*, a forma relativamente inativa, que pode ser estimulada por AMP, seu modulador alostérico. A fosforilase *b* quinase pode converter a fosforilase *b* em fosforilase *a* ativa por fosforilação dos resíduos Ser^{14}. Portanto, a glicogênio fosforilase e a glicogênio sintase são reguladas reciprocamente por esse ciclo de fosforilação-desfosforilação; quando uma enzima é estimulada, a outra é inibida (Fig. 20-15). Parece que essas duas enzimas jamais estão totalmente ativas simultaneamente.

No Capítulo 13 examinamos em detalhe a natureza das vias sinalizadoras e nossos exemplos incluíram o controle hormonal da glicogênio sintase e da glicogênio fosforilase. No fígado, o equilíbrio entre a síntese e a quebra do glicogênio é controlado pelos hormônios glucagon e insulina. Cada um desses hormônios age por meio de receptores específicos existentes na membrana plasmática e dispara uma cadeia de eventos que leva a mudanças na fosforilação de proteínas-alvo (veja Figs. 13-7 e 13-8), isso inclui a glicogênio sintase e a glicogênio fosforilase e ajusta seus respectivos níveis de atividade. Esses hormônios também regulam a concentração de frutose-2,6-bifosfato e, conseqüentemente, o equilíbrio entre gliconeogênese e glicólise. A **epinefrina** tem efeitos similares àqueles do glucagon, mas o seu

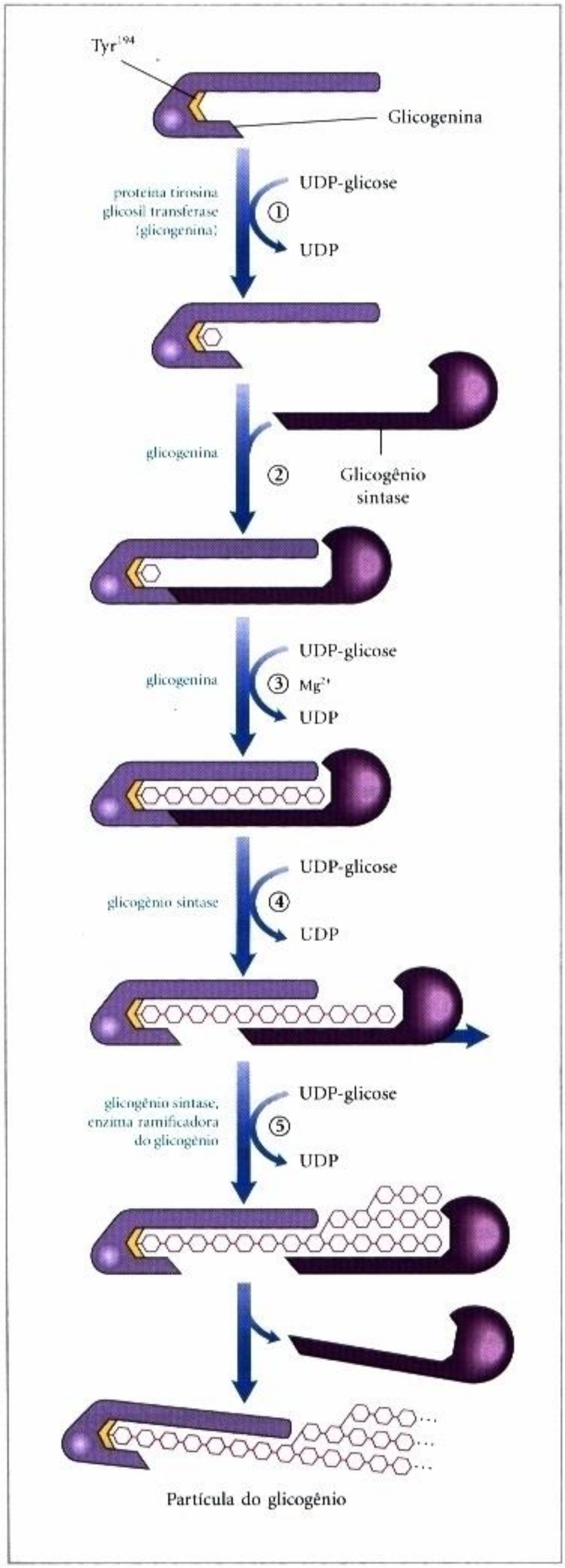

Tyr194
Glicogenina
proteína tirosina glicosil transferase (glicogenina)
UDP-glicose
①
UDP
glicogenina
②
Glicogênio sintase
glicogenina
UDP-glicose
③ Mg2+
UDP
glicogênio sintase
UDP-glicose
④
UDP
glicogênio sintase, enzima ramificadora do glicogênio
UDP-glicose
⑤
UDP
Partícula do glicogênio

Figura 20-14 – Início da síntese de uma partícula de glicogênio pela glicogenina. Os passos de ① a ⑤ estão descritos no texto. A glicogenina é encontrada no interior de partículas do glicogênio maduras, ainda covalentemente ligada na extremidade redutora da molécula.

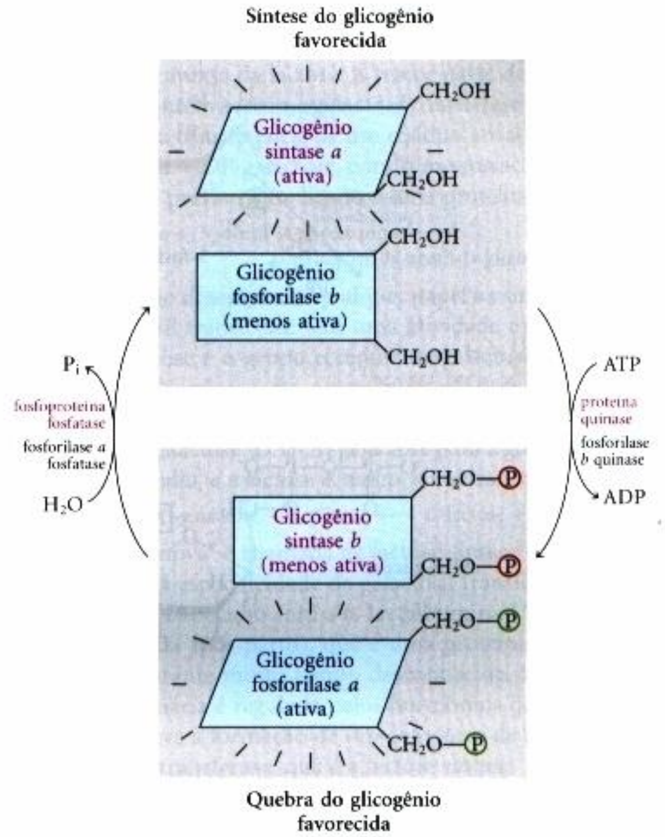

Síntese do glicogênio favorecida
Glicogênio sintase a (ativa)
CH2OH
CH2OH
Glicogênio fosforilase b (menos ativa)
CH2OH
CH2OH
Pi
fosfoproteína fosfatase
fosforilase a fosfatase
H2O
ATP
proteína quinase
fosforilase b quinase
ADP
Glicogênio sintase b (menos ativa)
CH2O—P
CH2O—P
Glicogênio fosforilase a (ativa)
CH2O—P
CH2O—P
Quebra do glicogênio favorecida

Figura 20-15 – Regulação recíproca da glicogênio sintase e da glicogênio fosforilase. Esta regulação ocorre por ciclos de fosforilação e desfosforilação. Em ambas as enzimas, o sítio de fosforilação é um resíduo de serina (representado aqui por —CH_2OH). As enzimas da síntese do glicogênio são mostradas em vermelho, e as da quebra do glicogênio, em preto.

alvo primário é o tecido muscular, enquanto a ação primária do glucagon ocorre no fígado. O papel regulador desses hormônios e os detalhes de suas ações nos tecidos-alvo serão considerados posteriormente, no Capítulo 23.

O substrato para a síntese do amido nos vegetais e para a síntese do glicogênio nas bactérias é a ADP-glicose

O amido, como o glicogênio, é um polímero de alto peso molecular, constituído por moléculas da D-glicose unidas por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$). A síntese do amido ocorre nos cloroplastos como um dos produtos estáveis da fotossíntese; essa síntese também ocorre em outras organelas e tecidos (os amiloplastos das partes não coloridas dos vegetais, como sementes, raízes e tuberosidades).

O mecanismo de polimerização das hexoses na síntese do amido é essencialmente similar àquele da síntese do glicogênio. Um açúcar nucleotídeo ativado, neste caso **ADP-glicose**, é sintetizado pela condensação da glicose-1-fosfato com o ATP.

A enzima **amido sintase** transfere então resíduos de glicose da ADP-glicose para a extremidade não-redutora de moléculas de amido preexistentes e que funcionam como moldes iniciais (Fig. 20-16). A reação envolve o deslocamento do ADP da ADP-glicose pelo ataque ao grupo hidroxila em C-4 do molde inicial, formando as ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) características do amido. A fração do amido chamada de amilose é não-ramificada, porém a outra fração, a amilopectina, tem numerosos ramos formados por ramificações ($\alpha 1 \rightarrow 6$), como aquelas do glicogênio, embora

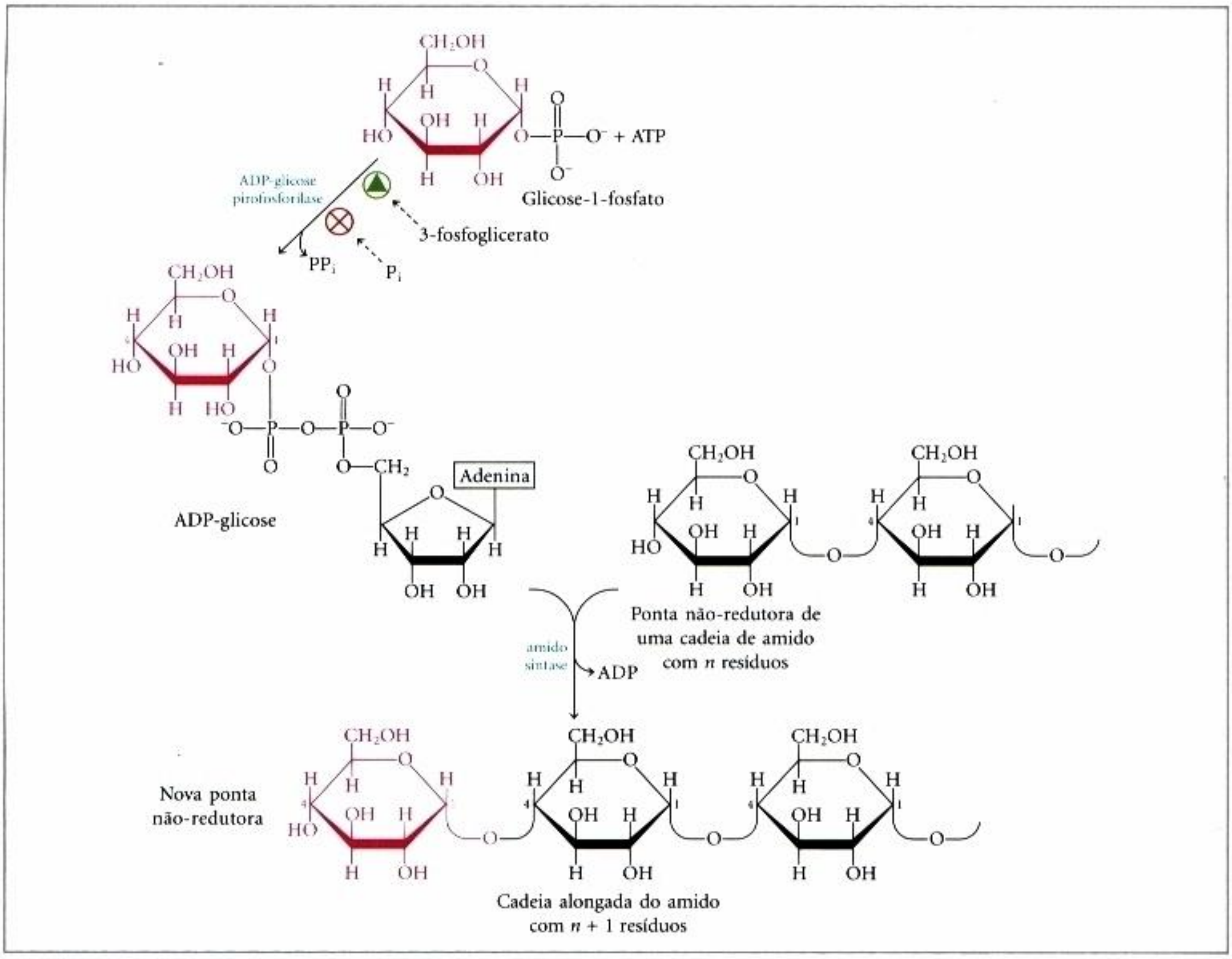

Glicose-1-fosfato
+ ATP
ADP-glicose pirofosforilase
3-fosfoglicerato
PP$_i$
P$_i$
ADP-glicose
Adenina
Ponta não-redutora de uma cadeia de amido com n resíduos
amido sintase
ADP
Nova ponta não-redutora
Cadeia alongada do amido com n + 1 resíduos

Figura 20-16 – A síntese do amido. Esta síntese ocorre por meio de um mecanismo análogo àquele da síntese do glicogênio (veja Fig. 20-12), exceto que o substrato ativado é a ADP-glicose em lugar da UDP-glicose. A glicose é transferida para a extremidade não-redutora de uma molécula de amido preexistente, por meio da formação de uma ligação ($\alpha1\rightarrow4$). Como exposto mais adiante neste capítulo, a ADP-glicose pirofosforilase é uma enzima reguladora.

em número menor (veja Fig. 9-15). Os cloroplastos contêm uma enzima ramificadora similar àquela envolvida na síntese do glicogênio (Fig. 20-13); ela introduz as ligações ($\alpha1\rightarrow6$) na amilopectina.

Com a hidrólise pela pirofosfatase inorgânica do PP$_i$ produzido durante a síntese da ADP-glicose, a reação global da adição de um mol de glicose ao amido a partir da glicose-1-fosfato é:

$$\text{Amido}_n + \text{glicose-1-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{amido}_{n+1} + \text{ADP} + 2\text{P}_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -50\,\text{kJ/mol}$$

A síntese do amido é regulada por ocasião da formação da ADP-glicose (Fig. 20-16), como iremos abordar depois, ainda neste capítulo.

As bactérias armazenam carboidratos na forma de glicogênio, que é sintetizado em uma reação análoga àquela catalisada pela glicogênio sintase nos animais. As bactérias, entretanto, empregam a ADP-glicose no lugar da UDP-glicose como a forma ativada da glicose.

A UDP-glicose é o substrato para a síntese da sacarose nos vegetais

A maior parte das trioses fosfato geradas pela assimilação de CO_2 nos vegetais é convertida em sacarose ou amido (Fig. 20-17). A sacarose foi selecionada durante a evolução como a forma de transporte do carbono nos vegetais possivelmente devido à ligação incomum existente entre o C-1 anomérico da glicose e o C-2 anomérico da frutose. Essa ligação não é hidrolisada quer pelas amilases quer pelas outras enzimas que rompem os carboidratos comuns, e o bloqueio dos carbonos anoméricos impede a sacarose de reagir não enzimaticamente, como o faz a glicose, com aminoácidos e proteínas.

A síntese da sacarose ocorre no citosol e inicia-se com as trioses, diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, exportadas do cloroplasto. Depois da condensação em frutose-1,6-bifosfato (catalisada pela aldolase), a hidrólise pela frutose-1,6-bifosfatase libera a frutose-6-fosfato. A **sacarose-6-fosfato sintase** catalisa a reação entre a frutose-6-fosfato e a UDP-glicose para formar a **sacarose-6-fosfato**. Finalmente, a **sacarose-6-fosfato fosfatase** remove o grupo fosfato, tornando a sacarose disponível para ser exportada da célula em que ocorre a síntese para outros tecidos na planta. A síntese da sacarose é regulada e cuidadosamente coordenada com a síntese do amido, como ainda veremos.

A síntese da lactose é regulada de maneira singular

A síntese da lactose na glândula mamária ocorre por um mecanismo similar àquele da síntese do glicogênio. Entretanto, a regulação da síntese da lactose é singular. Sob certas circunstâncias,

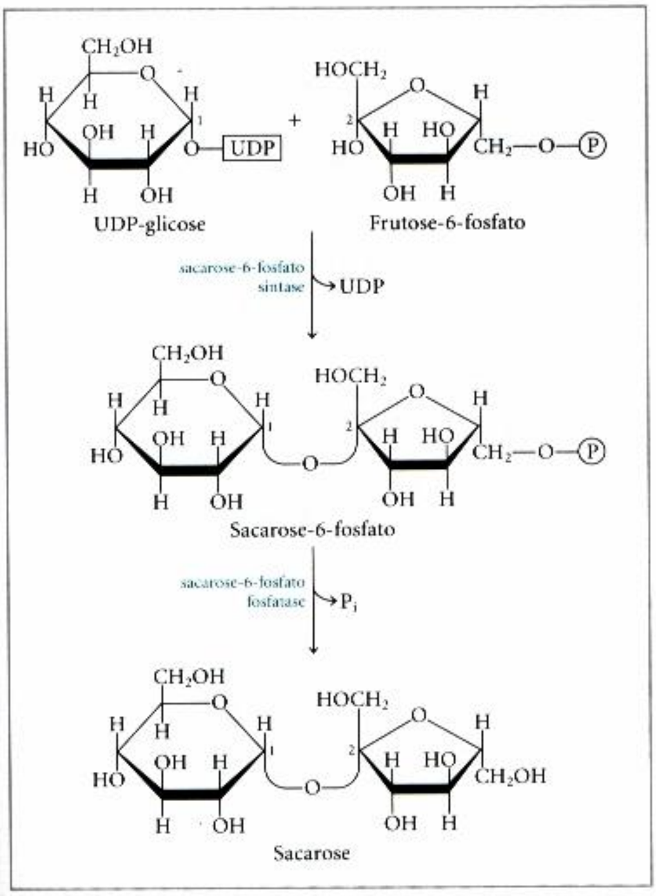

CH₂OH
HOCH₂
UDP
P
UDP-glicose
Frutose-6-fosfato
sacarose-6-fosfato sintase
UDP
Sacarose-6-fosfato
sacarose-6-fosfato fosfatase
Pᵢ
Sacarose

Figura 20-17 – A síntese da sacarose. A sacarose é sintetizada a partir da UDP-glicose e frutose-6-fosfato, sendo estas sintetizadas de trioses fosfato no citosol da célula vegetal por vias mostradas nas Figuras 20-11 e 20-25. A sacarose-6-fosfato sintase de muitas espécies vegetais é regulada alostericamente pela glicose-6-fosfato e P_i.

uma enzima normalmente específica para um substrato diferente e um papel metabólico diferente muda para uma forma que catalisa a síntese da lactose. A maior parte dos tecidos dos vertebrados contém a enzima **galactosil transferase** (Fig. 20-18a), que promove a transferência de um resíduo ativado de galactose, na forma de UDP-galactose, para o monossacarídeo *N*-acetilglicosamina previamente ligado a uma proteína:

UDP-D-galactose + *N*-acetil-D-glicosamina ⟶
D-galactosil-*N*-acetil-D-glicosamina + UDP

Essa reação não desempenha qualquer papel na síntese da lactose e a galactosil transferase tem uma atividade muito pequena quando a glicose é o grupo receptor de galactosil. Entretanto, imediatamente após o parto, a especificidade da galactosil transferase na glândula mamária sofre uma mudança: agora ela transfere o grupo galactosil da UDP-galactose para a glicose em velocidade muito alta, e a lactose é, assim, sintetizada:

UDP-D-galactose + D-glicose ⟶ D-lactose + UDP

Esta enzima "nova" é chamada de **lactose sintase** (Fig. 20-18b). A mudança na especificidade da galactosil transferase é provocada pela sua associação com a α-**lactalbumina** (M_r 13.500) recém-sintetizada (pós-parto), que é uma proteína do leite cuja função foi durante muito tempo desconhecida. Sua síntese na glândula mamária é regulada pelos hormônios que promovem a lactação e leva à formação de um complexo de α-**lactalbumina-galactosil transferase**, que é a lactose sintase.

A UDP-glicose é um intermediário na formação do glicuronato e da vitamina C

A glicose, em muitos microrganismos, origina o **D-glicuronato** por meio da UDP-glicose, um componente das glicosaminoglicanas e participante essencial de muitos processos de detoxicação e da síntese da **vitamina C**. A porção glicose da UDP-glicose é oxidada para formar UDP-glicuronato pela UDP-glicose desi-

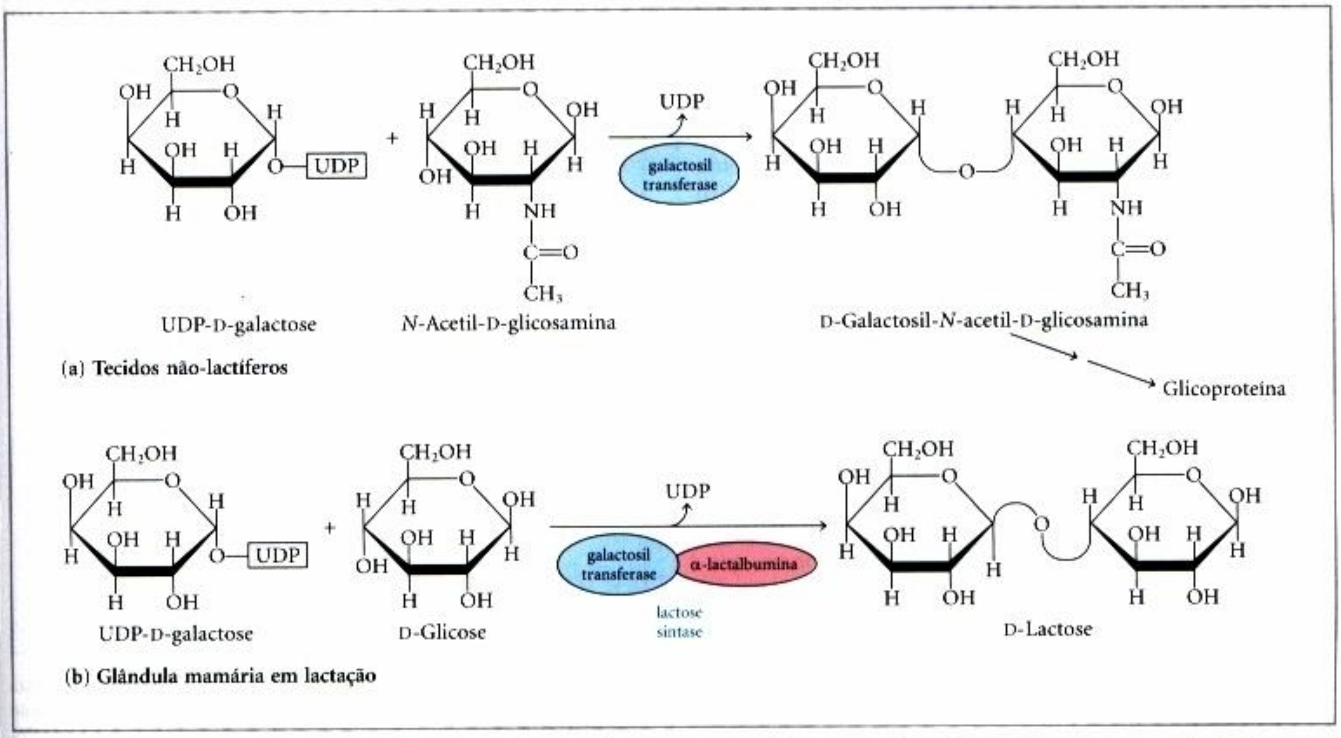

UDP-D-galactose
N-Acetil-D-glicosamina
UDP
galactosil transferase
D-Galactosil-N-acetil-D-glicosamina
Glicoproteína
(a) Tecidos não-lactíferos
UDP-D-galactose
D-Glicose
UDP
galactosil transferase
α-lactalbumina
lactose sintase
D-Lactose
(b) Glândula mamária em lactação

Figura 20-18 – A síntese da lactose. A galactosil transferase catalisa duas reações diferentes na dependência da presença ou ausência da α-lactalbumina, produzida apenas na glândula mamária em lactação. (**a**) A reação que ocorre nos tecidos que não produzem leite. (**b**) A reação na glândula mamária em lactação.

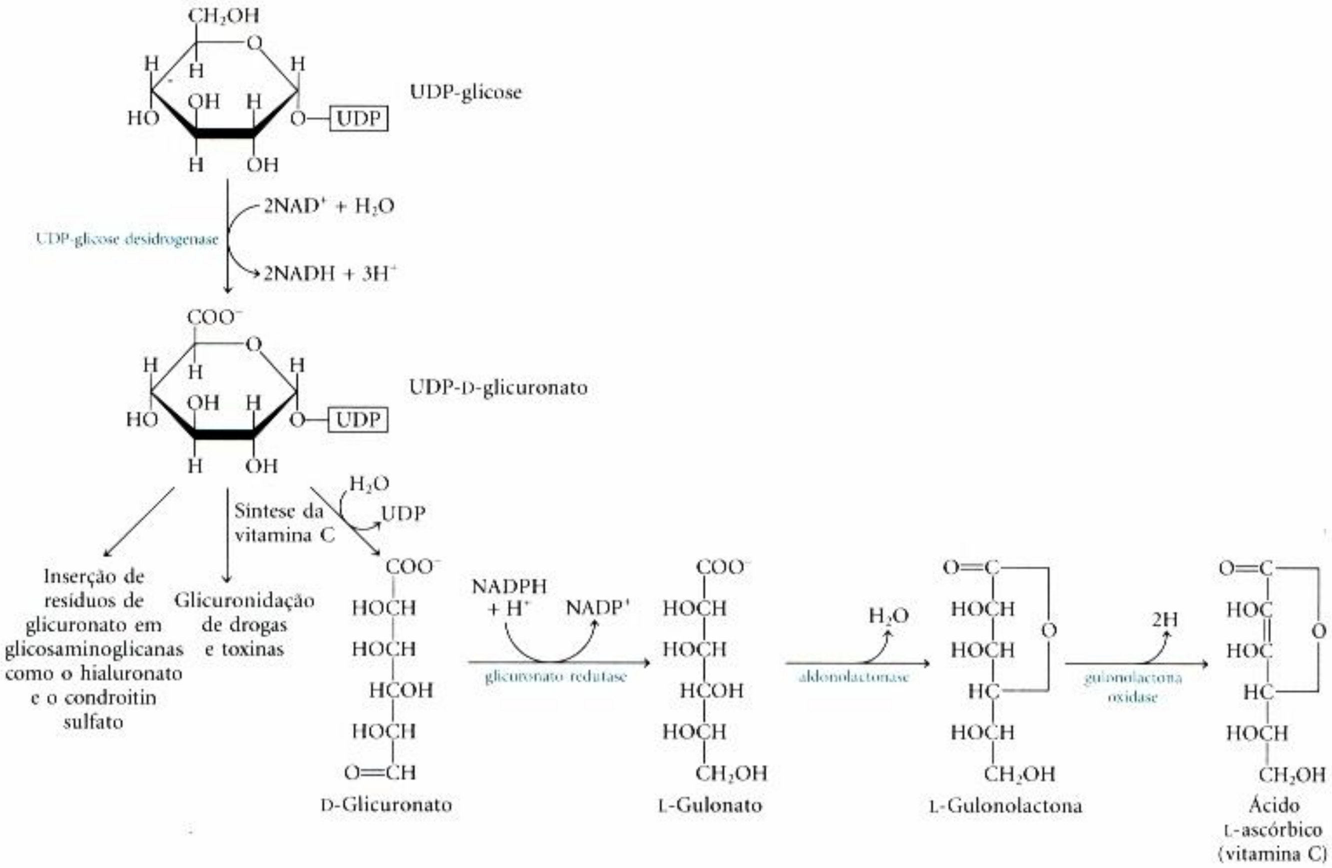

UDP-glicose
UDP-glicose desidrogenase
2NAD⁺ + H₂O
2NADH + 3H⁺
UDP-D-glicuronato
Inserção de resíduos de glicuronato em glicosaminoglicanas como o hialuronato e o condroitin sulfato
Glicuronidação de drogas e toxinas
Síntese da vitamina C
H₂O
UDP
NADPH + H⁺
NADP⁺
glicuronato redutase
H₂O
aldonolactonase
2H
gulonolactona oxidase
D-Glicuronato
L-Gulonato
L-Gulonolactona
Ácido L-ascórbico (vitamina C)

Figura 20-19 – Síntese do glicuronato e da vitamina C. O UDP-glicuronato, formado da glicose, como mostrado aqui, é o precursor dos resíduos de glicuronato (GlcA) nas glicosaminoglicanas (veja Fig. 9-20) e da vitamina C (ácido ascórbico) e participa nas reações de detoxicação.

drogenase (Fig. 20-19). O UDP-glicuronato é o precursor dos resíduos glicuronato de polissacarídeos ácidos como os glicosaminoglicanos: hialuronato e condroitin sulfato (Fig. 9-20). Esse derivado do UDP também está envolvido na detoxicação e na excreção de compostos orgânicos estranhos ao organismo.

O UDP-glicuronato é o doador de glicuronosil empregado por uma família de enzimas detoxificantes que agem sobre várias drogas não-polares, toxinas ambientais e carcinogênios. A conjugação dessas substâncias com o glicuronato é denominada **glicuronação** e as converte em derivados polares mais facilmente eliminados da circulação para a urina através dos rins. São exemplos disso: a droga sedativa fenobarbital, a droga anti-HIV AZT e a forma hidroxilada do carcinogênio benzo[*a*]pireno (3-hidroxibenzo[*a*]pireno), todas elas são glicuroniladas por meio da ação das UDP-glicuronosil transferases presentes no fígado humano (Fig. 20-20). A exposição crônica a essas drogas ou toxinas induz a síntese aumentada da enzima específica o que aumenta a tolerância para a respectiva droga ou a resistência à toxina.

O D-glicuronato, formado pela hidrólise do UDP-glicuronato, é o precursor do ácido L-ascórbico (Fig. 20-19). Nessa via, o D-glicuronato é reduzido ao açúcar ácido L-gulonato, que é convertido em sua lactona. A L-gulonolactona é desidrogenada por uma flavoproteína **gulonolactona oxidase** para liberar o ácido L-ascórbico ou vitamina C. Algumas espécies animais, como humanos, cobaias, macacos, alguns pássaros e alguns peixes, não possuem a gulonolactona oxidase e são incapazes de sintetizar o ácido ascórbico que, por isso, precisa ser ingerido. As frutas cítricas e o tomate são especialmente ricos em ácido ascórbico. As pessoas que não ingerem vitamina C suficiente desenvolvem uma

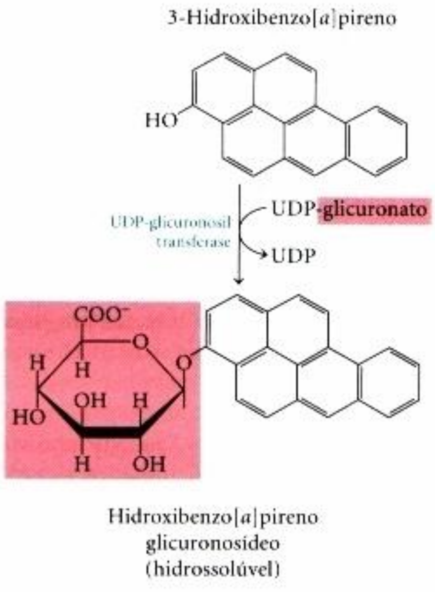

3-Hidroxibenzo[a]pireno
HO
UDP-glicuronosil transferase
UDP-glicuronato
UDP
COO⁻
Hidroxibenzo[a]pireno glicuronosídeo (hidrossolúvel)

Figura 20-20 – Papel do UDP-glicuronato na detoxicação. Aqui está mostrada a detoxicação do 3-hidroxibenzo[*a*]pireno, um componente tóxico presente na fumaça do tabaco. A glicuronação pela transferência de glicuronato do UDP-glicuronato converte a toxina não-polar em um composto polar e, portanto, mais facilmente removível do sangue pelos rins.

doença grave chamada escorbuto; nessas pessoas, a síntese do tecido conjuntivo, que contém colágeno, é defeituosa. Os sintomas do escorbuto incluem dentes abalados com gengivas inchadas e hemorrágicas, articulações enrijecidas e dolorosas, hemorragias subcutâneas e cicatrização lenta dos ferimentos. Por séculos essa doença foi muito comum entre aqueles que faziam viagens marítimas prolongadas, durante as quais não havia ingestão de frutas frescas. Em 1753, o médico naval James Lind mostrou que o escorbuto podia ser prevenido e curado pela ingestão de sucos de frutas cítricas. Em 1932 o composto antiescorbuto vitamina C foi isolado do suco do limão e denominado ácido ascórbico (da palavra latina *scorbutus*).

Compostos carboidrato-nucleotídeo são os precursores empregados na síntese da parede celular de bactérias

O peptideoglicano que dá força e rigidez ao envoltório bacteriano é um copolímero linear alternante de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido *N*-acetilmurâmico (Mur2Ac), unidos por ligações glicosídicas $(\beta 1 \rightarrow 4)$ e com ligações cruzadas efetuadas por pequenos peptídeos ligados aos Mur2Ac (veja Fig. 9-19). Durante a construção do esqueleto polissacarídico dessa molécula complexa, ambos, GlcNAc e Mur2Ac, são ativados pela ligação de um nucleotídeo de uridina aos seus carbonos anoméricos. Primeiro, o GlcNAc-1-fosfato condensa com o UTP para formar UDP-GlcNAc (Fig. 20-21, passo ①) o qual reage com o fosfoenolpiruvato para formar UDP-Mur2Ac (passo ②); cinco aminoácidos são então adicionados (passo ③). A porção Mur2Ac-pentapeptídeo é transferida do nucleotídeo de uridina para um álcool isoprenóide de cadeia longa (o dolicol, veja Fig. 11-20f) (passo ④) e o resíduo GlcNAc é doado por UDP-GlcNAc (passo ⑤). Em muitas bactérias, cinco glicinas são adicionadas por meio de ligação peptídica ao grupo amino do resíduo de lisina pertencente ao pentapeptídeo (passo ⑥). Finalmente, esse complexo decapeptídeo-dissacarídeo é adicionado à extremidade não-redutora de uma molécula de peptideoglicana preexistente (passo ⑦). Uma reação de transpeptidação faz o entrecruzamento de cadeias polissacarídicas adjacentes (passo ⑧), contribuindo para a formação de uma parede grande e forte que envolve a célula bacteriana. Muitos dos antibióticos mais efetivos atualmente em uso agem pela inibição das reações de síntese do peptideoglicano (Adendo 20-1). Sem o suporte da camada formada por peptideoglicano, a célula bacteriana é frágil e muito sujeita à lise osmótica.

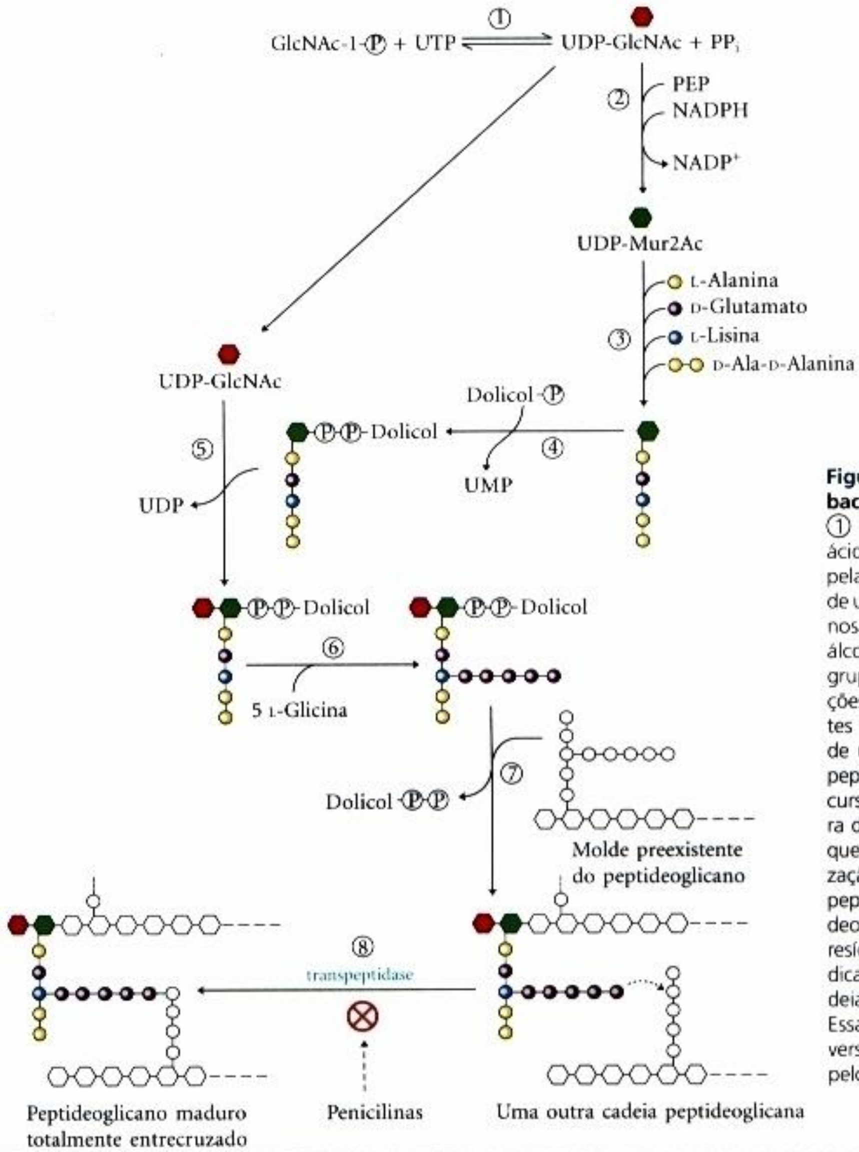


Figura 20-21 – Síntese do peptideoglicano bacteriano. Nos primeiros passos dessa via (de ① até ④), a *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e o ácido *N*-acetilmurâmico (Mur2Ac) são ativados pela união, por meio de uma ligação fosfodiéster, de um nucleotídeo de uridina (UDP) em seus carbonos anoméricos e, no caso do Mur2Ac, de um álcool isoprenil de cadeia longa (dolicol). Esses grupos ativadores participam da formação de ligações glicosídicas; eles funcionam como excelentes grupos de saída. Depois da ligação, ⑤ e ⑥, de um dissacarídeo com a cadeia lateral de um peptídeo (10 resíduos de aminoácidos), este precursor é transferido (⑦) para a ponta não-redutora de uma cadeia peptideoglicana preexistente e que serve como molde para a reação de polimerização. Finalmente, ocorre uma reação de transpeptidação (⑧) entre as cadeias laterais dos peptídeos em duas moléculas do peptideoglicano. Um resíduo de glicina na extremidade da cadeia peptídica desloca uma D-alanina terminal na outra cadeia polipeptídica formando uma ligação cruzada. Essa reação de transpeptidação é inibida pelas diversas formas da penicilina e isso mata as bactérias pelo enfraquecimento das suas paredes celulares.

Adendo 20-1 A penicilina e a β-lactamase: A bala mágica contra o colete à prova de balas

Como os peptideoglicanos são exclusivos das paredes celulares bacterianas, sem estruturas homólogas conhecidas entre os mamíferos, as enzimas responsáveis por sua síntese são alvos ideais para a ação de antibióticos. Antibióticos que atingem alvos bacterianos específicos são algumas vezes chamados de "balas mágicas". A penicilina e seus muitos análogos sintéticos têm sido empregados para tratamento médico de infecções bacterianas desde quando essas medicações passaram a ser amplamente empregadas na época da Segunda Guerra Mundial.

Penicilinas e antibióticos relacionados contêm o anel β-lactama (Fig. 1), que é modificado de diferentes maneiras. Todas as penicilinas contêm um anel tiazolidina ligado à β-lactama, mas elas diferem no substituinte na posição seis, que é responsável pelas diferentes propriedades farmacológicas das diferentes penicilinas. Por exemplo, a penicilina V é estável em meios ácidos e pode ser administrada por via oral, mas a meticilina é instável em meio ácido e precisa ser administrada por via intravenosa ou intramuscular. Entretanto a meticilina resiste ao ataque de enzimas bacterianas (β-lactamases) enquanto muitas outras penicilinas não o fazem. As β-lactamas têm muitas propriedades que caracterizam um bom medicamento. Primeiro, elas têm como alvo uma via metabólica presente nas bactérias mas não no organismo humano. Segundo, introduzidas no organismo, elas têm período de meia-vida suficientemente longo para serem clinicamente úteis. Terceiro, elas atingem concentrações terapêuticas na maioria dos tecidos e órgãos, se não em todos. Finalmente, elas são efetivas contra um largo espectro de espécies bacterianas.

As penicilinas bloqueiam a formação das ligações entrecruzadas nos peptideoglicanos, atuando como inibidores de ação baseada em um mecanismo (suicida). O mecanismo catalítico normal das enzimas-alvo ativam o inibidor e este modifica covalentemente um resíduo essencial no sítio ativo. As transpeptidases empregam um mecanismo de reação (envolvendo resíduos de serina) similares àquele da quimotripsina (veja Fig. 8-19); a reação ativa as

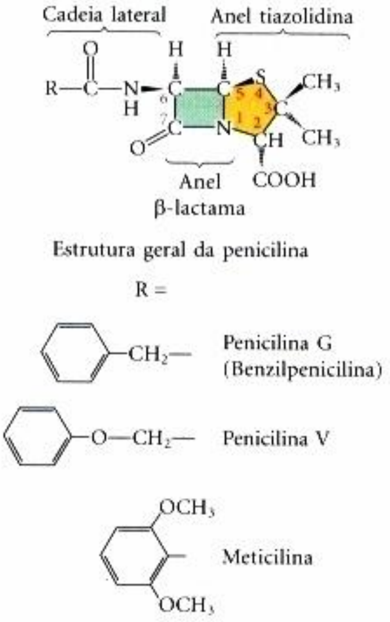


Figura 1

Muitos outros oligo e polissacarídeos são sintetizados por vias similares nas quais os açúcares são ativados para, subseqüentemente, reagir e se ligar a nucleotídeos. Na glicosilação de proteínas, por exemplo (veja Fig. 27-36), os precursores das porções de carboidratos são complexos carboidrato-nucleotídeo.

Fotossíntese dos Carboidratos

A síntese dos carboidratos nas células animais sempre emprega precursores que possuem pelo menos três átomos de carbono, todos em um estado de oxidação menor que o carbono no CO_2. Os organismos fotossintéticos, pelo contrário, podem fazer carboidratos de CO_2 e água por meio da redução do CO_2 que utiliza a energia fornecida pelo ATP e pelo NADPH gerados na transferência fotossintética de elétrons. Esse processo representa uma diferença fundamental entre os organismos autotróficos (fototróficos ou quimiotróficos) e heterotróficos. Os autotróficos, como os vegetais, podem empregar o CO_2 como a única fonte de todos os átomos de carbono necessários para as reações de biossíntese, não apenas da celulose e do amido, mas também dos lipídios e proteínas e de todos os muitos e variados componentes orgânicos das células vegetais. Os organismos heterotróficos, ao contrário, são em geral incapazes de realizar a redução do CO_2 para formar glicose "nova". O dióxido de carbono pode ser captado pelos tecidos animais, como na reação da piruvato carboxilase durante a gliconeogênese, mas a molécula de CO_2 incorporada no oxaloacetato é perdida em um passo da reação subseqüente (veja Fig. 20-3). De forma similar, o CO_2 captado pela acetil-CoA carboxilase durante a síntese dos ácidos graxos (veja Fig. 21-1) ou pela carbamil fosfato sintetase I durante a formação da uréia (veja Fig. 18-9) é perdido em passos posteriores.

As plantas verdes contêm em seus cloroplastos uma maquinaria enzimática única que catalisa a conversão do CO_2 em compostos orgânicos simples (reduzidos), em um processo denominado **assimilação do CO_2**. Esse processo também é chamado **fixação do CO_2**, ou **fixação do carbono**, mas neste texto reservamos esses termos para as reações em que o carbono é incorporado (fixado) no 3-fosfoglicerato. Esse produto simples da fotossíntese é o precursor de biomoléculas mais complexas, incluindo açúcares e polissacarídeos e seus derivados metabólicos, sintetizados em vias metabólicas em tudo similares àquelas exisβ-lactamas, como a penicilina, que, por sua vez, inativam as transpeptidases. Depois que a penicilina entra no sítio ativo da transpeptidase, o próton no grupo hidroxila de um resíduo de serina do sítio ativo é abstraído para o nitrogênio do anel da β-lactama e o oxigênio da hidroxila da serina ataca o carbono carbonila na posição 7 da β-lactama, isso abre o anel e forma um derivado penicilinoil-enzima estável que inativa a enzima (Fig. 2a).

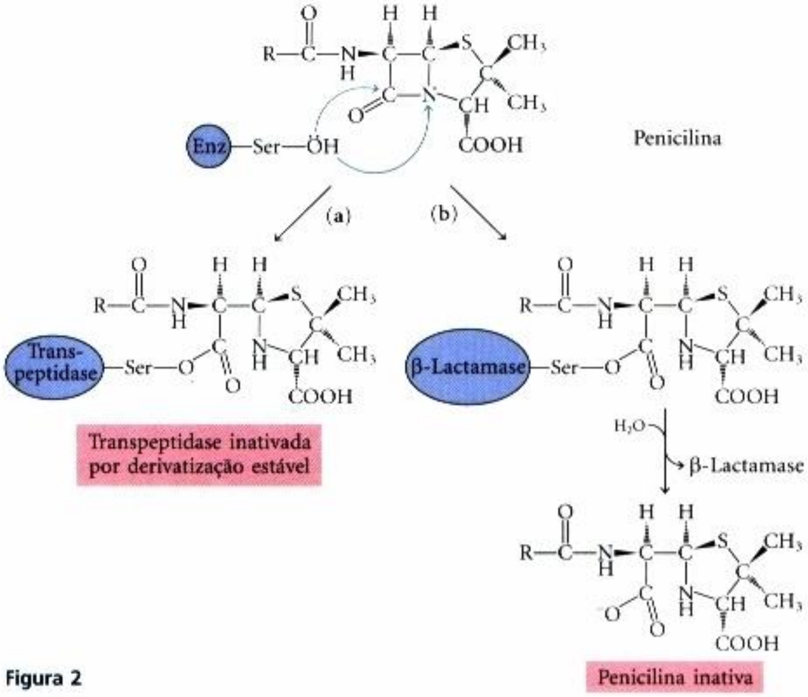


Figura 2

O emprego freqüente e generalizado dos antibióticos vem conduzindo a seleção e a evolução da resistência a eles em muitas bactérias patogênicas. O mecanismo mais importante dessa resistência é a inativação do antibiótico pela hidrólise enzimática do anel lactama catalisada por β-lactamases bacterianas, o que fornece à bactéria um "colete à prova de balas" (Fig. 2b). A β-lactamase forma um aducto covalente temporário com o grupo carboxila do anel lactama aberto, que é imediatamente hidrolisado, regenerando a enzima ativa. Uma forma de evitar esse tipo de resistência ao antibiótico é sintetizar análogos da penicilina, como a meticilina, que são maus substratos para as β-lactamases. Outra maneira é administrar junto com o antibiótico um inibidor da β-lactamase tal como as drogas clavulanato e sulbactama.

A resistência aos antibióticos é uma ameaça significativa à saúde pública. Algumas infecções bacterianas são, atualmente, essencialmente não tratáveis com antibióticos. No início da década de 1990, 20% a 40% das cepas de *Staphylococcus aureus* eram resistentes à meticilina e 32% das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* eram resistentes à penicilina. Em 1986, 32% das amostras de *Shigella* (uma bactéria responsável por formas graves de disenteria, algumas com letalidade de 15%) eram resistentes à ampicilina. É significativo constatar que muitos desses patógenos são também resistentes a muitos outros antibióticos. No futuro precisaremos desenvolver novos medicamentos que evitem os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias ou que tenham ação sobre outros alvos bacterianos.

tentes nos animais. A assimilação do CO_2 se realiza por meio de uma via cíclica na qual os intermediários-chave são constantemente regenerados. Essa via foi elucidada nos primeiros anos da década de 1950 por Melvin Calvin e colaboradores, sendo freqüentemente chamada de **ciclo de Calvin**.

Melvin Calvin
(1911-1997)

A assimilação do CO_2 ocorre em três estágios

O primeiro estágio na assimilação do CO_2 em substâncias orgânicas (Fig. 20-22) é uma reação de fixação do carbono: sua condensação com um receptor de cinco átomos de carbono, a **ribulose-1,5-bifosfato**, para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato (observe que a Figura 20-22 mostra o número de moléculas que reagem para tornar possível a formação líquida de uma molécula de triose — e isso representa a captação de três moléculas de CO_2). No segundo estágio, o 3-fosfoglicerato é reduzido a gliceraldeído-3-fosfato; três moléculas de CO_2 são fixadas em três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato para formar seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (18 carbonos) em equilíbrio com a diidroxiacetona fosfato. No terceiro estágio, cinco das seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (15 carbonos) são empregadas para regenerar três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato, o material inicial. Assim, o processo global é cíclico e permite a contínua conversão de CO_2 em triose e hexose fosfato. A frutose-6-fosfato é um intermediário-chave no estágio 3, ela representa um ponto de ramificação que tanto pode levar à regeneração da ribulose-1,5-bifosfato como à síntese de amido. A via da hexose fosfato para pentose bifosfato envolve as mes-

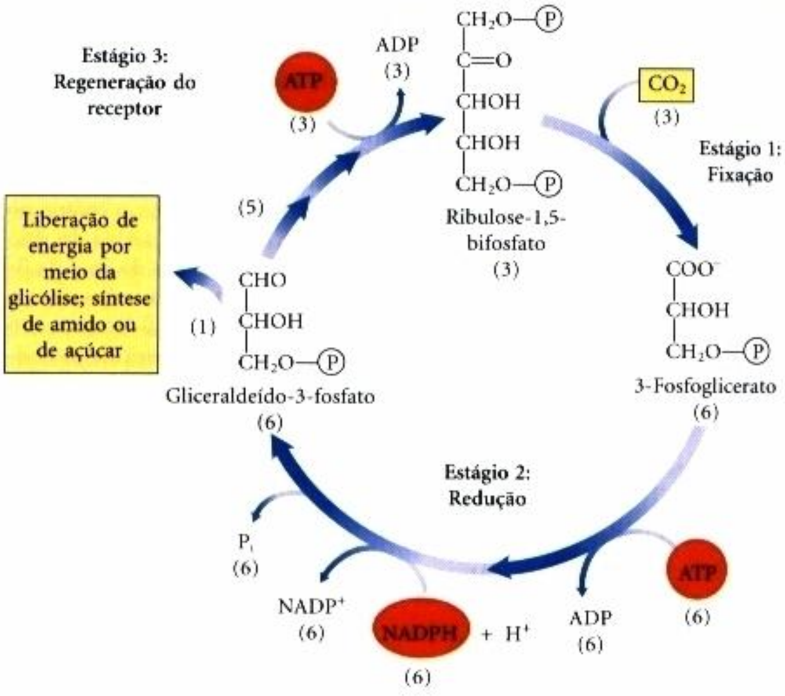


Figura 20-22 – Os três estágios da assimilação do CO_2 em organismos fotossintéticos. Os números entre parênteses mostram a estequiometria dos três intermediários-chave de tal forma que é aparente o destino dos átomos de carbono que entram e saem do ciclo. Como mostrado aqui, três moléculas de CO_2 são fixadas para permitir a síntese líquida de uma molécula do gliceraldeído-3-fosfato. Este é o chamado ciclo de redução fotossintética do carbono ou ciclo de Calvin.

mas reações empregadas nas células animais para a conversão das pentoses fosfato em hexoses fosfato durante a operação da **via das pentoses fosfato**, uma rota alternativa para a oxidação da glicose (veja Fig. 15-20). Na assimilação fotossintética do CO_2, essa via opera em direção oposta, convertendo as hexoses fosfato em pentoses fosfato. Esse ciclo redutivo das pentoses fosfato usa as mesmas enzimas da via oxidativa e diversas outras que tornam o ciclo redutivo irreversível.

Estágio 1: fixação do CO_2 em 3-fosfoglicerato. Uma primeira pista importante para a natureza do mecanismo de assimilação do CO_2 nos organismos fotossintéticos foi obtida nos últimos anos da década de 1940, quando Calvin e seus colaboradores iluminaram uma suspensão de algas verdes na presença de dióxido de carbono radioativo ($^{14}CO_2$) por apenas alguns segundos. A seguir, eles mataram rapidamente as células, extraíram seu conteúdo e, com a ajuda de métodos cromatográficos, procuraram pelos metabólitos marcados pelo carbono radioativo. O primeiro composto a se tornar marcado foi o **3-fosfoglicerato**, com o ^{14}C predominantemente localizado no átomo de carbono carboxila. Esse átomo não se torna rapidamente marcado nos tecidos animais na presença de CO_2 radioativo. Esses experimentos sugeriram fortemente que o 3-fosfoglicerato é um intermediário precoce na fotossíntese. A enzima presente nos extratos de folhas verdes que catalisa a incorporação de CO_2 na forma orgânica é a **ribulose-1,5-bifosfato carboxilase** ou **RuBP carboxilase/oxigenase** (chamada abreviadamente de **rubisco**). (A atividade de oxigenase das enzimas será discutida posteriormente neste capítulo.) Como uma carboxilase, a rubisco catalisa a ligação covalente do CO_2 ao açúcar com cinco átomos de carbono ribulose-1,5-bifosfato e a clivagem do intermediário instável de seis carbonos para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato, uma das quais carrega um novo carbono introduzido como CO_2 em seu grupo carboxila (Fig. 20-23).

A enzima rubisco de vegetais, a enzima-chave na produção de biomassa a partir de CO_2, tem uma estrutura complexa (Fig. 20-24a, b). Existem oito subunidades grandes, cada uma delas com M_r 56.000 e contendo um sítio ativo, e oito subunidades pequenas (cada uma com M_r 14.000), cujas funções ainda não são bem compreendidas. A estrutura em subunidades da enzima rubisco das bactérias fotossintéticas é muito diferente, com duas subunidades semelhantes àquelas grandes subunidades da enzima vegetal em muitos aspectos (Fig. 20-24c). A enzima vegetal está localizada no estroma do cloroplasto e representa até perto de 50% da sua proteína total. A rubisco é a enzima mais abundante na biosfera.

Estágio 2: conversão do 3-fosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato. O 3-fosfoglicerato formado no estágio 1 é convertido em gliceraldeído-3-fosfato em dois passos que são, essencialmente, a reversão dos passos correspondentes na glicólise, com uma exceção: o co-fator nucleotídico para a redução do 1,3-bifosfoglicerato é o NADPH e não o NADH (Fig. 20-25). O estroma do cloroplasto contém um conjunto completo das enzimas glicolíticas com exceção da fosfoglicerato mutase. Essas enzimas do estroma são isozimas daquelas encontradas no citosol; os dois conjuntos de enzimas catalisam as mesmas reações, mas elas são produtos de genes diferentes.

No primeiro passo da seqüência, a **3-fosfoglicerato quinase**, no estroma, catalisa a transferência do fosfato do ATP para o 3-fosfoglicerato, formando 1,3-bifosfoglicerato (Fig. 20-25). Então o NADPH cede os seus elétrons em uma reação de redução catalisada pela enzima **gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase**, produzindo gliceraldeído-3-fosfato. A enzima triose fosfato isomerase interconverte as trioses gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. Essas trioses fosfato ou são convertidas em amido no cloroplasto, que é estocado para uso posterior, ou são imediatamente exportadas para o citosol e convertidas em sacarose, que é transportada para as partes da planta que estão em crescimento. Nas folhas em crescimento, a energia adicional necessária pode ser fornecida por uma porção importante das trioses fosfato que é degradada pela glicólise (Fig. 20-25).

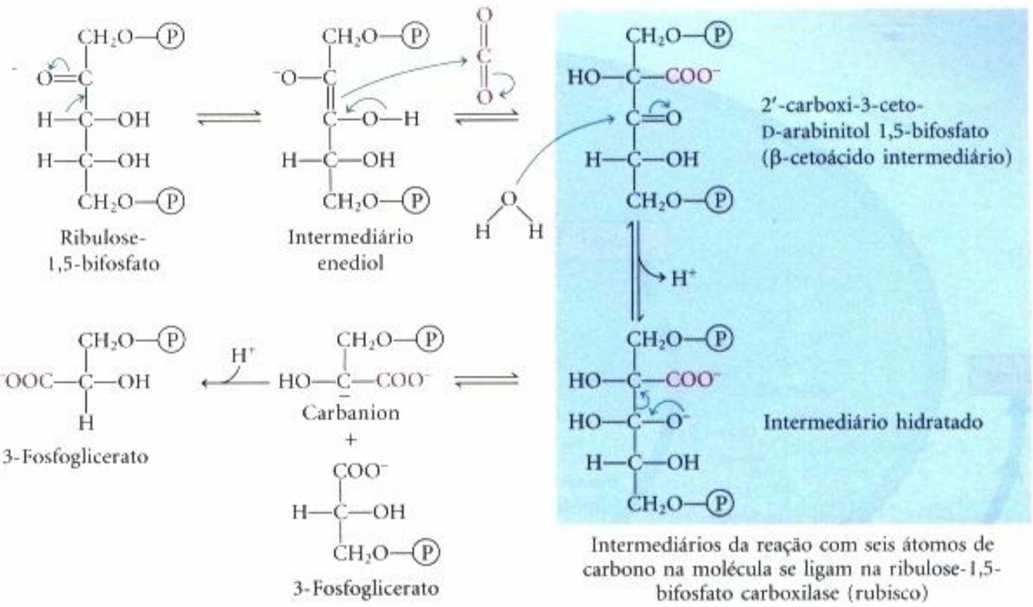
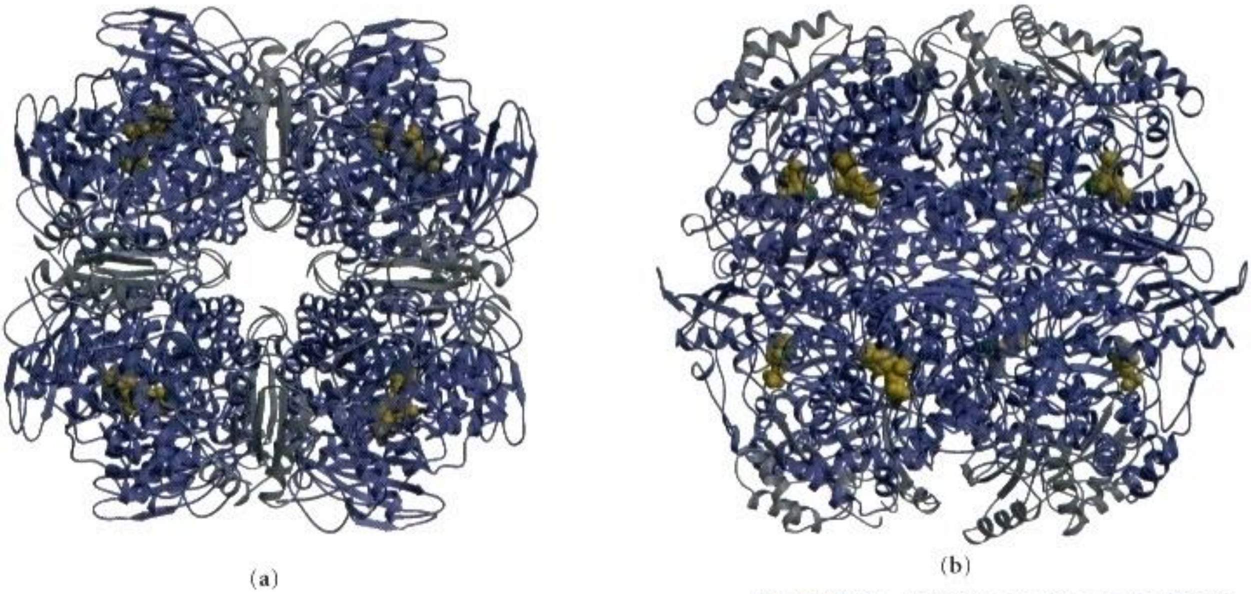

Ribulose-1,5-bifosfato
Intermediário enediol
2'-carboxi-3-ceto-D-arabinitol 1,5-bifosfato (β-cetoácido intermediário)
Intermediário hidratado
Carbanion
3-Fosfoglicerato
3-Fosfoglicerato
Intermediários da reação com seis átomos de carbono na molécula se ligam na ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (rubisco)

Figura 20-23 – O primeiro estágio da assimilação do CO_2. A reação de fixação do CO_2 é catalisada pela ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (rubisco). Acredita-se que o intermediário carboxilado da reação é o β-cetoácido de seis átomos de carbono que fica ligado à enzima e que é mostrado aqui; ele é hidrolisado e liberado da superfície da enzima como dois produtos idênticos com três átomos de carbono cada um, um deles contém o átomo de carbono originariamente no CO_2 (vermelho).


(a) (b)

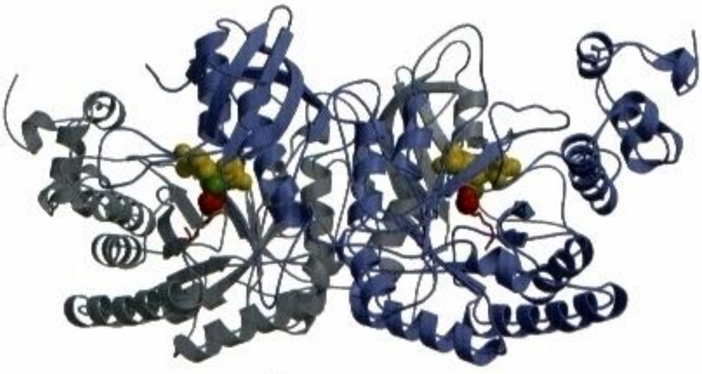

(c)

Figura 20-24 – Estrutura da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (rubisco). (**a**) Vista superior e (**b**) vista lateral de um modelo do tipo fita da enzima rubisco do espinafre, baseado em análises por difração com raios X da enzima cristalina. Existem oito grandes subunidades (mostradas em azul) e oito unidades pequenas (em cinza), firmemente empacotadas em uma estrutura de *M*, 550.000. A enzima rubisco está presente em uma concentração de perto de 250mg/mL no estroma do cloroplasto, correspondente a uma concentração extraordinariamente alta de sítios ativos (~4mM). Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo são mostrados em amarelo. (**c**) Modelo do tipo fita da enzima rubisco da bactéria *Rhodospirillum rubrum*. As subunidades estão mostradas em cinza e azul. Um resíduo de lisina no sítio ativo, que é carboxilado para formar um carbamato no sítio ativo (veja Fig. 20-33), está mostrado em vermelho. O substrato, ribulose-1,5-bifosfato está em amarelo.

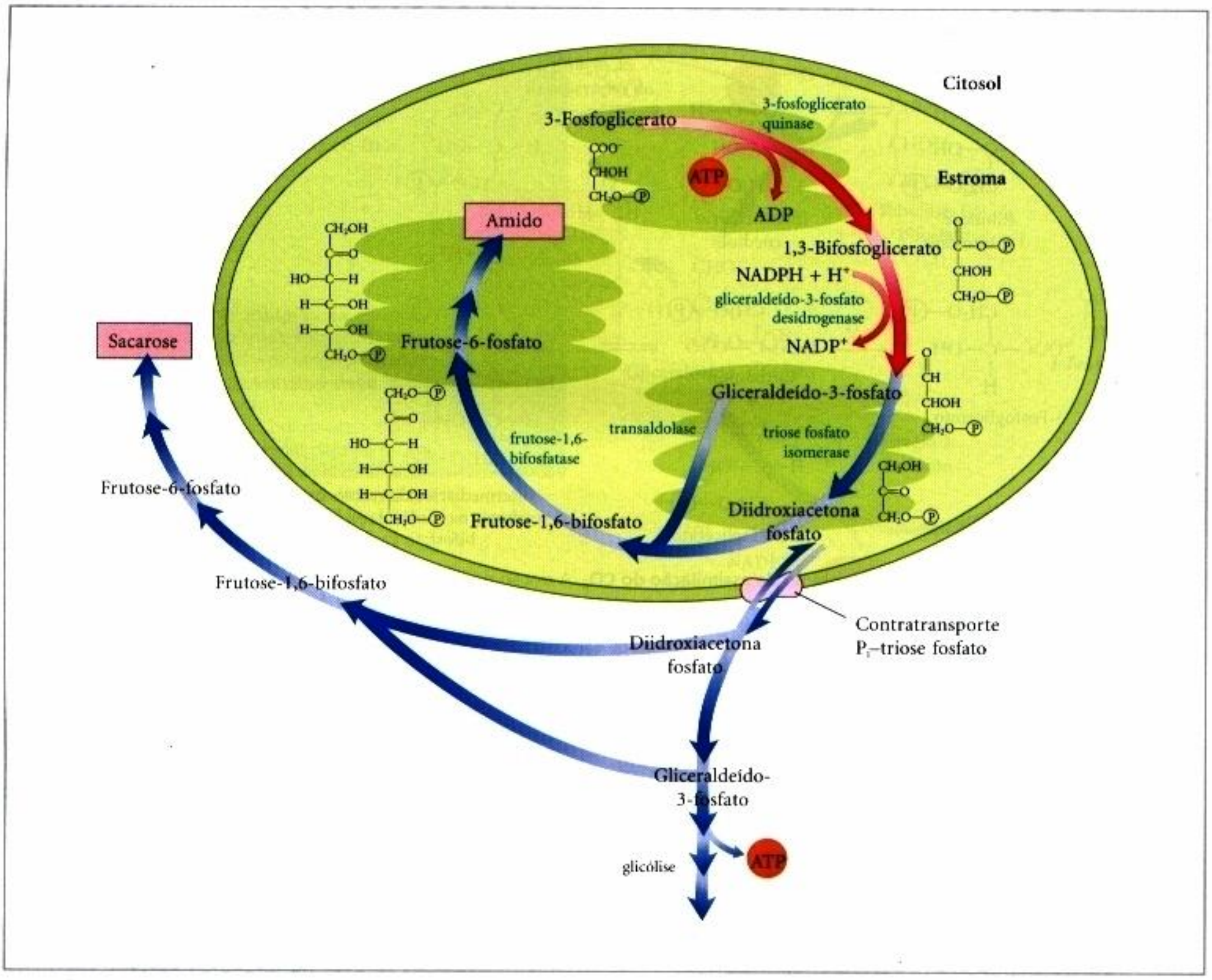

Citosol
3-Fosfoglicerato
3-fosfoglicerato quinase
ATP
ADP
Estroma
1,3-Bifosfoglicerato
NADPH + H⁺
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
NADP⁺
Gliceraldeído-3-fosfato
triose fosfato isomerase
Diidroxiacetona fosfato
transaldolase
Frutose-1,6-bifosfato
frutose-1,6-bifosfatase
Frutose-6-fosfato
Amido
Sacarose
Frutose-6-fosfato
Frutose-1,6-bifosfato
Contratransporte Pᵢ–triose fosfato
Diidroxiacetona fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
glicólise
ATP

Figura 20-25 – A segunda fase da assimilação do CO_2. O 3-fosfoglicerato é convertido em gliceraldeído-3-fosfato (setas vermelhas). Também estão mostrados os destinos alternativos do átomo de carbono fixado no gliceraldeído-3-fosfato (setas azuis). A maior parte é reciclada para formar ribulose-1,5-bifosfato como mostrado na Figura 20-26. O gliceraldeído-3-fosfato "extra" pode ser empregado imediatamente como fonte de energia, ou convertido em sacarose para transporte, ou, ainda, armazenado como amido para uso futuro. Se o gliceraldeído-3-fosfato é necessário para a síntese de amido, ele condensa com a diidroxiacetona fosfato no estroma e é convertido em frutose-1,6-bifosfato, a precursora do amido. Em outras situações, ele é convertido em diidroxiacetona fosfato, que deixa o cloroplasto por meio de um transportador específico (veja Fig. 20-31). No citosol a diidroxiacetona fosfato pode ser degradada por meio da glicólise para fornecer energia ou ser empregada para formar a frutose-6-fosfato e, então, sacarose.

Estágio 3: regeneração da ribulose-1,5-bifosfato a partir das trioses fosfato. Como já foi visto, a primeira reação na assimilação do CO_2 nas trioses fosfato consome ribulose-1,5-bifosfato. Para que o fluxo de CO_2 que se transforma em carboidrato seja contínuo, a ribulose-1,5-bifosfato precisa ser constantemente regenerada. As células vegetais resolveram esse problema com uma série de reações que, junto com os estágios 1 e 2 descritos anteriormente, formam uma via cíclica (Fig. 20-26). Por essa via o produto da primeira reação (3-fosfoglicerato) passa por uma série de transformações que ao final levam à regeneração do material de partida, ribulose-1,5-bifosfato. Assim, a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato envolve rearranjos dos esqueletos carbônicos do gliceraldeído-3-fosfato e da diidroxiacetona fosfato produzidas nos primeiros dois estágios da assimilação do carbono. Os intermediários na via incluem açúcares com 3, 4, 5, 6 e 7 átomos de carbono. Na discussão a seguir, todos os números dos passos referem-se àqueles indicados na Figura 20-26.

Os passos ① e ④ são promovidos pela transaldolase, que catalisa a condensação reversível do gliceraldeído-3-fosfato com a diidroxiacetona fosfato (passo ①) como na glicólise e da eritrose-4-fosfato com a diidroxiacetona fosfato (passo ④), formando o composto com sete átomos de carbono, a **sedoeptulose-1,7-bifosfato**. Os passos ③ e ⑥ são catalisados pela enzima **transcetolase**, que contém a tiamina pirofosfato (TPP) como grupo prostético (veja Fig. 15-9a) e requer Mg^{2+}. A transcetolase catalisa a transferência reversível de um grupo cetol (CH_2OH—CO—) de uma cetose fosfato doadora, frutose-6-fosfato no passo ③, para uma aldose fosfato receptora, o gliceraldeído-3-fosfato (Fig. 20-27a, b). No passo ⑥, as mesmas reações básicas convertem a sedoeptulose-7-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato em duas pentoses fosfato (Fig. 20-27c). A Figura 20-28 mostra como um fragmento com dois átomos de carbono são temporariamente transportados pelo TPP e condensados com o gliceraldeído-3-fosfato, com três átomos de carbono (passo ⑥).

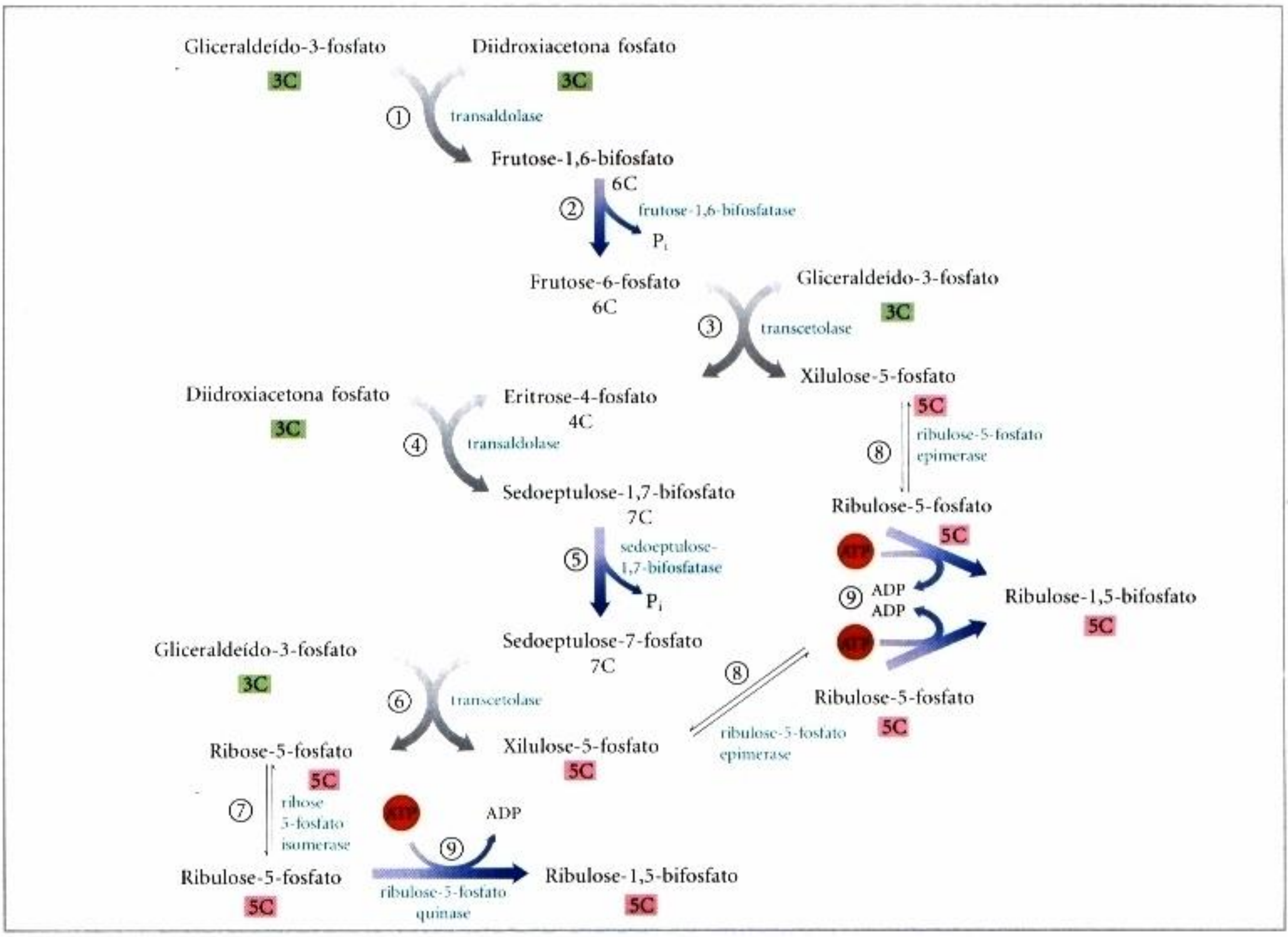
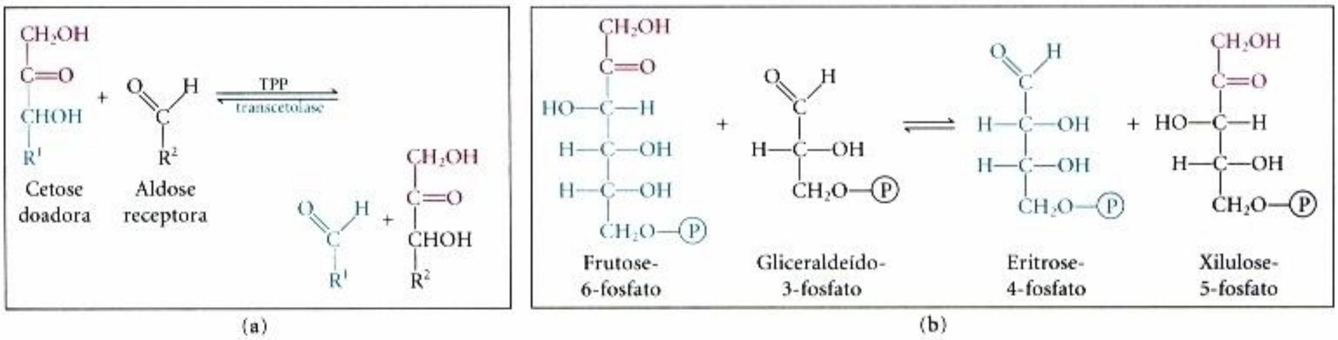
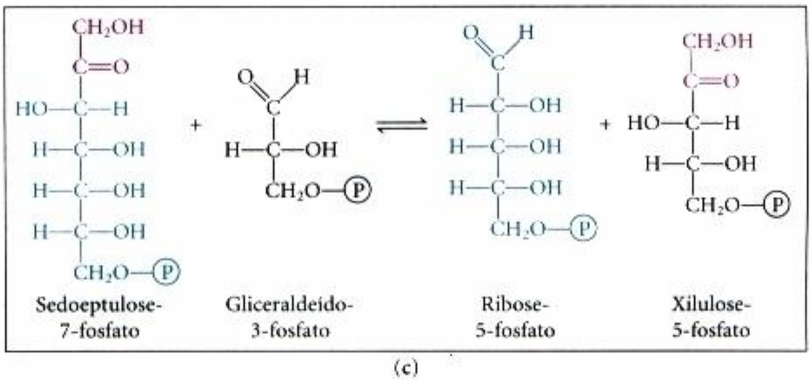

Gliceraldeído-3-fosfato
3C
Diidroxiacetona fosfato
3C
①
transaldolase
Frutose-1,6-bifosfato
6C
②
frutose-1,6-bifosfatase
Pᵢ
Frutose-6-fosfato
6C
Gliceraldeído-3-fosfato
3C
③
transcetolase
Xilulose-5-fosfato
5C
Diidroxiacetona fosfato
3C
Eritrose-4-fosfato
4C
④
transaldolase
Sedoeptulose-1,7-bifosfato
7C
⑧
ribulose-5-fosfato epimerase
Ribulose-5-fosfato
5C
⑤
sedoeptulose-1,7-bifosfatase
Pᵢ
ATP
ADP
⑨
ADP
ATP
Ribulose-1,5-bifosfato
5C
Sedoeptulose-7-fosfato
7C
Gliceraldeído-3-fosfato
3C
⑧
⑥
transcetolase
Ribulose-5-fosfato
5C
Ribose-5-fosfato
5C
Xilulose-5-fosfato
5C
ribulose-5-fosfato epimerase
⑦
ribose 5-fosfato isomerase
ATP
ADP
⑨
Ribulose-5-fosfato
5C
ribulose-5-fosfato quinase
Ribulose-1,5-bifosfato
5C

Figura 20-26 – O terceiro estágio na assimilação do CO_2. Este diagrama esquemático mostra a interconverão das trioses fosfato (compostos com 3C; em verde) e pentoses fosfato (compostos com 5C; em vermelho). Os materiais de partida são as trioses fosfato: gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. As reações catalisadas pela transaldolase (passos ① e ④) e transcetolase (passos ③ e ⑥) produzem as pentoses fosfato, que são convertidas em ribulose-1,5-bifosfato — ribose-5-fosfato pela ribose-5-fosfato isomerase (⑦) e xilulose-5-fosfato pela ribulose-5-fosfato epimerase (⑧). No passo ⑨ a ribulose-5-fosfato é fosforilada, regenerando a ribulose-1,5-bifosfato. Os passos com setas azuis são exergônicos e tornam irreversível o processo todo: passos ② (frutose-1,6-bifosfatase), ⑤ (sedoeptulose bifosfatase) e ⑨ (ribulose-5-fosfato quinase).


TPP
transcetolase
Cetose doadora
Aldose receptora
Frutose-6-fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
Eritrose-4-fosfato
Xilulose-5-fosfato

(a)

(b)


Sedoeptulose-7-fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
Ribose-5-fosfato
Xilulose-5-fosfato

(c)

Figura 20-27 – As reações do ciclo de Calvin catalisadas pela transcetolase. (**a**) A reação geral catalisada pela transcetolase é a transferência de um grupo de dois carbonos, transportado temporariamente pelo TPP ligado à enzima, de uma cetose doadora para uma aldose receptora. (**b**) Conversão de uma hexose e de uma triose em uma pentose e uma tetrose pela ação da transcetolase (passo ③ da Fig. 20-26). (**c**) Conversão dos açúcares de sete e de três átomos de carbono em duas pentoses pela ação da transcetolase (passo ⑥ da Fig. 20-26).

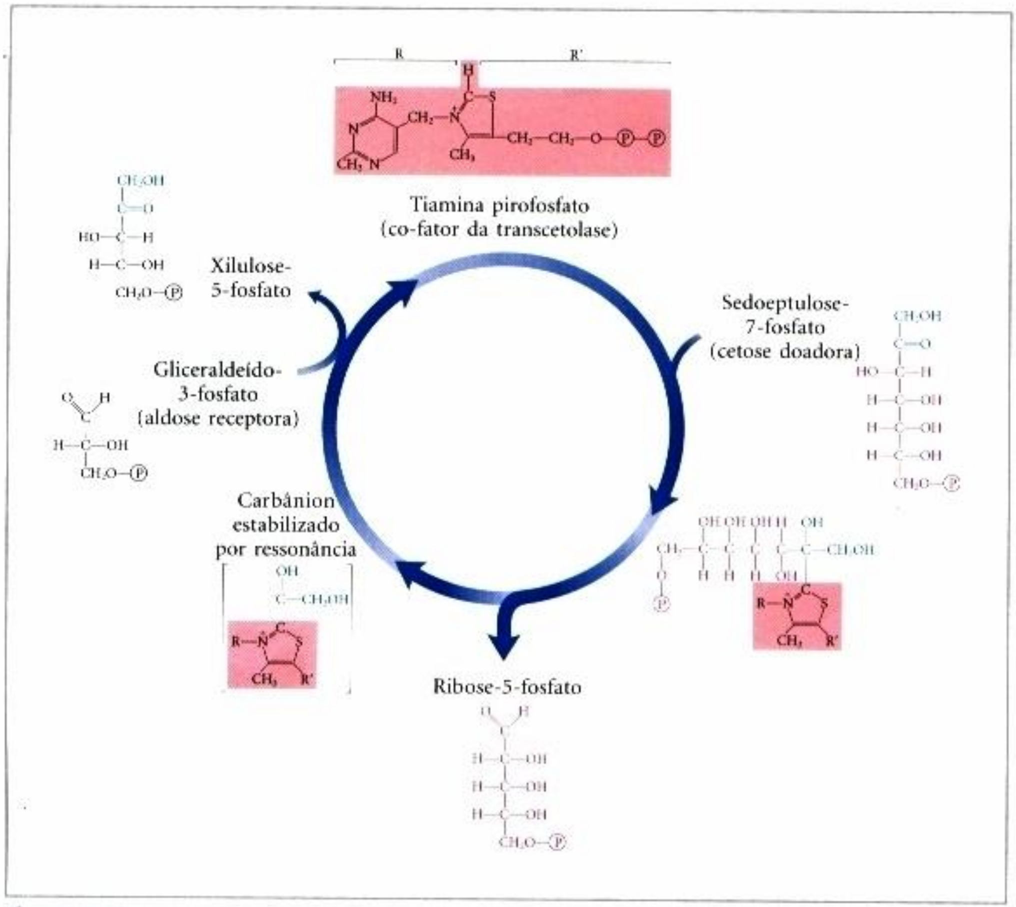


Figura 20-28 – A transcetolase transfere um grupo de dois átomos de carbono da sedoeptulose-7-fosfato para o gliceraldeído-3-fosfato, produzindo duas pentoses fosfato (passo ⑥ da Fig. 20-26). A tiamina pirofosfato funciona como um transportador temporário de uma unidade de dois átomos de carbono e como um escoadouro de elétrons (veja Fig. 15-9) para facilitar as reações.

As pentoses fosfato formadas na reação da transcetolase — ribose-5-fosfato e xilulose-5-fosfato — são convertidas em **ribulose-5-fosfato** (passos ⑦ e ⑧), a qual, no passo final do ciclo (passo ⑨), é fosforilada pela ribulose-5-fosfatoquinase (Fig. 20-29) e passa a ribulose-1,5-bifosfato. Essa é a terceira reação fortemente exergônica da via.

Cada triose fosfato sintetizada a partir de CO_2 custa seis NADPH e nove ATP

O resultado líquido final do ciclo de Calvin é a conversão de três moléculas de CO_2 e uma molécula de fosfato em uma molécula de triose fosfato. A estequiometria global da via do CO_2 até triose fosfato, com a regeneração de ribulose-1,5-bifosfato, está mostrada na Figura 20-30. Três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato (um total de 15 átomos de carbono) condensam com três moléculas de CO_2 (três carbonos) para formar seis moléculas de 3-fosfoglicerato (18 carbonos). Essas seis moléculas de 3-fosfoglicerato são quimicamente reduzidas para seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, com o consumo de seis ATP (na síntese de 1,3-bifosfoglicerato) e seis NADPH (na redução de 1,3-bifosfoglicerato para gliceraldeído-3-fosfato). *Uma destas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato é o produto líquido do processo.* As outras cinco moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (15 carbonos) são rearranjadas nos passos ① a ⑨ da Figura 20-26 para formar três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato (15 carbonos). O último passo nessa conversão requer um ATP por ribulose-1,5-bifosfato, ou seja, um total de três ATP. Assim, para cada molécula de triose fosfato produzida pela assimilação fotossintética do CO_2, são necessários seis NADPH e nove ATP.

A fonte de ATP e NADPH para as reações de síntese das trioses fosfato são as reações potenciadas pela luz da fotossíntese (Capítulo 19), que produzem NADPH e ATP quase na mesma proporção (2:3) em que são consumidas no ciclo de Calvin. Das nove moléculas de ATP convertidas para ADP e fosfato na geração de uma molécula de triose fosfato, oito dos fosfatos são liberados como P_i e combinados com oito ADP para regenerar o ATP. O nono fosfato é incorporado na própria triose fosfato. Para converter o nono ADP em ATP, uma molécula de P_i precisa ser importada do citosol, como veremos adiante.

No escuro, a produção de ADP e NADPH pela fotofosforilação cessa e a incorporação de CO_2 na triose fosfato (por meio das chamadas "reações escuras") também cessa. Como descrito no Capítulo 18, as "reações escuras" da fotossíntese são chamadas assim para distingui-las das reações primárias potenciadas pela luz de transferência de elétrons para o $NADP^+$ e a síntese do ATP descritas no Capítulo 19. Nos organismos fotossintéticos, de fato, elas não ocorrem em velocidades significativas no escuro (embora elas o façam nos organismos quimiotróficos). Portanto, uma denominação mais adequada para elas é a de **reações de assimilação do carbono**. Adiante neste capítulo descreveremos os mecanismos regulatórios que ligam a assimilação do carbono quando há luz e a desligam no escuro.

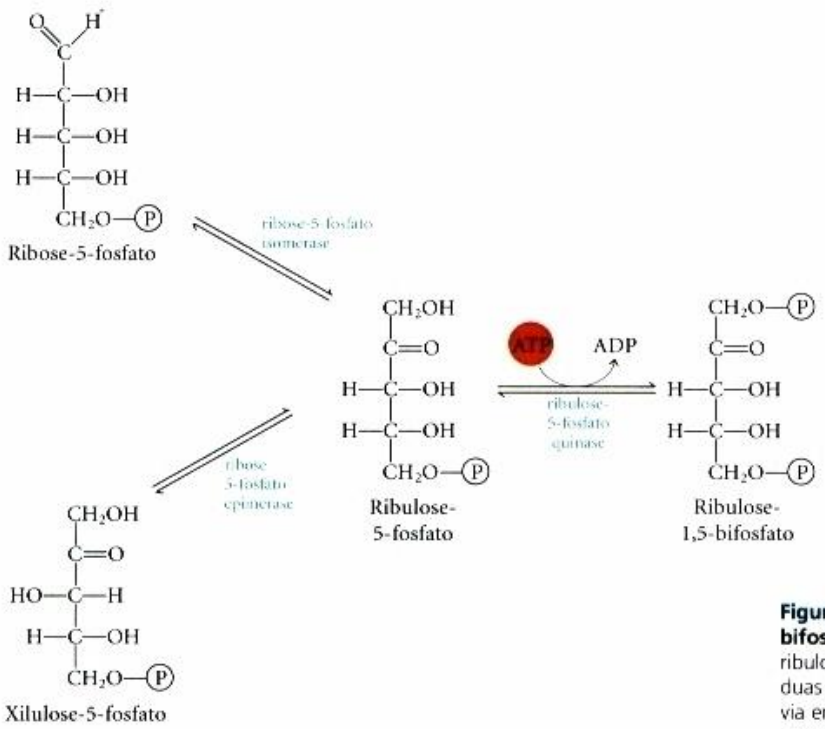

Ribose-5-fosfato
ribose-5-fosfato isomerase
ATP
ADP
ribulose-5-fosfato quinase
Ribulose-5-fosfato
Ribulose-1,5-bifosfato
ribose 5-fosfato epimerase
Xilulose-5-fosfato

Figura 20-29 – A regeneração da ribulose-1,5-bifosfato. O composto inicial do ciclo de Calvin, ribulose-1,5-bifosfato, é regenerado a partir das duas pentoses fosfato produzidas no ciclo. Esta via envolve a ação de uma isomerase e uma epimerase, seguida de uma fosforilação por uma quinase, com o ATP como doador do grupo fosfato (passos ⑦, ⑧ e ⑨ da Fig. 20-26).

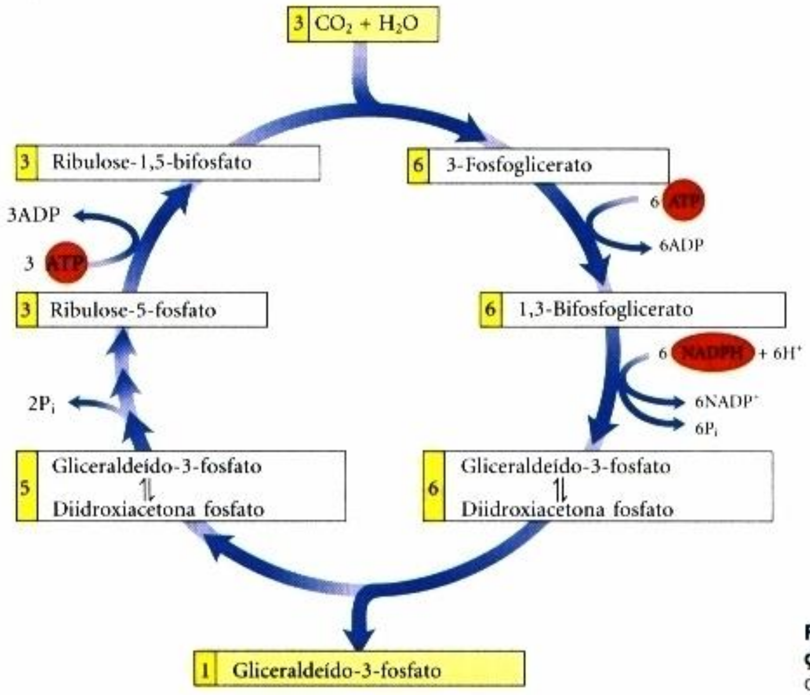

3 CO₂ + H₂O
6 3-Fosfoglicerato
6 ATP
6ADP
6 1,3-Bifosfoglicerato
6 NADPH + 6H⁺
6NADP⁺
6Pᵢ
6 Gliceraldeído-3-fosfato ⇅ Diidroxiacetona fosfato
1 Gliceraldeído-3-fosfato
5 Gliceraldeído-3-fosfato ⇅ Diidroxiacetona fosfato
2Pᵢ
3 Ribulose-5-fosfato
3 ATP
3ADP
3 Ribulose-1,5-bifosfato

Figura 20-30 – A estequiometria da assimilação do CO_2 por meio do ciclo de Calvin. Para cada três moléculas de CO_2 fixadas, é produzida uma molécula de triose fosfato (gliceraldeído-3-fosfato) e nove ATP e seis NADPH são consumidos.

Os átomos de carbono fixos gerados no cloroplasto também são estocados aí em quantidades significativas. No interior do estroma do cloroplasto estão todas as enzimas necessárias para converter as trioses fosfato produzidas pela assimilação do CO_2 (gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato) em amido, o qual é armazenado no cloroplasto como grânulos insolúveis. A aldolase condensa as duas trioses em frutose-1,6-bifosfato, a frutose-1,6-bifosfatase libera a frutose-6-fosfato, a fosfoexose isomerase produz a glicose-6-fosfato e a fosfoglicomutase produz glicose-1-fosfato, o material de partida para a síntese do amido.

Todas as reações do ciclo de Calvin também ocorrem em tecidos animais, exceto aquelas catalisadas pela rubisco, pela sedoeptulose-1,7-bifosfatase e pela ribulose-5-fosfato quinase, respectivamente. Por não possuírem essas três enzimas (e a abundância em ATP e NADPH fornecida pelas reações dependentes de luz da fotossíntese), os animais não podem realizar a conversão líquida de CO_2 em glicose.

Um sistema de transporte do cloroplasto exporta trioses fosfato e importa fosfato

A membrana interna do cloroplasto é impermeável para a maioria dos compostos fosforilados, incluindo frutose-6-fosfato, glicose-6-fosfato e frutose-1,6-bifosfato. Entretanto, existe um transportador específico (contratransporte) que catalisa a troca um por um de P_i por triose fosfato, quer esta seja diidroxiacetona fosfato ou 3-fosfoglicerato (Fig. 20-31; veja também a Fig. 20-25). Esse contratransporte move simultaneamente a triose fosfato para fora do cloroplasto, ou seja, para o citosol, e o P_i para o interior dos cloroplastos, onde ele é empregado na fotofosforilação.

Sem esse sistema de contratransporte, a assimilação de CO_2 no cloroplasto seria reduzida drasticamente. Assim, o transporte efetivo das trioses fosfato para fora do cloroplasto faz a remoção das trioses fosfato oriundas da assimilação do carbono. No citosol essas trioses fosfato são convertidas em sacarose pelas vias ilustradas nas Figuras 20-25 e 20-17. A síntese da sacarose no citosol e a síntese do amido do cloroplasto são as duas grandes formas pelas quais o excesso de trioses fosfato é armazenado. Os passos da síntese da sacarose liberam quatro moléculas de P_i de cada uma das quatro trioses fosfato requeridas para a síntese de uma molécula de sacarose. Esse P_i é transportado de volta ao cloroplasto e empregado na síntese de ATP, substituindo a molécula de P_i que, como foi descrito, foi empregada para gerar uma triose fosfato. Para cada molécula de triose fosfato que sai do cloroplasto, um P_i é transportado para o seu interior. Se essa troca for bloqueada, a síntese de trioses fosfato rapidamente reduzirá o P_i disponível no cloroplasto e impedirá a continuação da assimilação de CO_2 no amido.

Esse sistema contratransporte P_i–triose fosfato tem uma outra função adicional. No citosol existe uma grande variedade de reações sintéticas que consomem energia na forma de ATP e de força redutora química. Essas necessidades energéticas são supridas pelas mitocôndrias em um grau ainda indeterminado. Uma segunda fonte potencial dessa energia é representada pelos ATP e NADPH gerados no estroma durante as reações luminosas da fotossíntese; entretanto, o ATP e o NADPH não cruzam a membrana do cloroplasto. O sistema contratransporte das trioses fosfato tem o efeito indireto de mover o ATP e os equivalentes redutores através da membrana do cloroplasto (Fig. 20-32). A diidroxiacetona fosfato formada no estroma pela assimilação do CO_2 é transportada para o citosol, onde ela é convertida pelas enzimas glicolíticas em 3-fosfoglicerato, gerando ATP e NADH. O 3-fosfoglicerato reentra no cloroplasto, completando o ciclo. O efeito líquido final é o transporte de NADPH/NADH e ATP do cloroplasto para o citosol.

Regulação do Metabolismo dos Carboidratos em Vegetais

O metabolismo dos carboidratos nas células vegetais é mais complexo que nas células animais ou nos microrganismos que não realizam a fotossíntese. Além das vias universais da glicólise e da gliconeogênese, os vegetais têm uma singular seqüência de reações que promove a redução do CO_2 em trioses fosfato e a via redutora associada das pentoses fosfato — todas essas vias precisam ser reguladas de forma coordenada para evitar ciclos fúteis desperdiçadores e para assegurar a alocação adequada dos carbonos para a produção de energia e para a síntese do amido e da sacarose. Enzimas-chave são reguladas por um ou mais dos seguintes mecanismos:

1. Redução de pontes dissulfeto por elétrons fluindo do fotossistema I.
2. Mudanças no pH e na concentração do Mg^{2+} que resultam da iluminação.
3. Regulação alostérica convencional por um ou mais intermediários metabólicos.
4. Modificação covalente.

A enzima rubisco é submetida à regulação tanto positiva quanto negativa

Sendo o sítio onde se inicia a fixação fotossintética do O_2, a enzima rubisco é o primeiro alvo dos mecanismos de regulação. Um tipo de regulação envolve a carbamilação de um resíduo de lisina (Fig. 20-33a, b). Em níveis altos de CO_2 isso ocorre de forma não-enzimática. Entretanto, o substrato para essa enzima, ribulose-1,5-bifosfato, inibe a carbamilação e esse efeito é quase completo em concentrações fisiológicas de CO_2. Uma enzima chamada **rubisco ativase** supera essa inibição pela promoção da liberação de ribulose-1,5-bifosfato dependente de ATP, que expõe o grupo amino do resíduo de lisina da rubisco à carbamilação pelo CO_2, o que resulta em ativação da enzima.

A forma carbamilada da rubisco não é mais inibida pela ribulose-1,5-bifosfato, mas o 2-carboxiarabinitol 1-fosfato, um análogo do estado de transição de ocorrência natural (veja Adendo 8-3), com uma estrutura similar àquela do intermediário β-cetoácido da reação da rubisco (Figs. 20-23 e 20-33c) permanece como um inibidor potente. Esse composto é sintetizado no escuro por algumas plantas para reprimir a atividade da rubisco e algumas vezes é chamado de "inibidor noturno". Ele é quebrado quando a luz retorna, permitindo uma reativação da rubisco.

Algumas enzimas do ciclo de Calvin são ativadas indiretamente pela luz

A assimilação redutiva do CO_2 requer ATP e NADPH e suas concentrações no estroma aumentam quando os cloroplastos são iluminados (Fig. 20-34). O transporte de prótons induzidos pela luz através da membrana tilacóide (Capítulo 19) também transforma o compartimento estromal em alcalino e é acompanhado pelo fluxo de Mg^{2+} para fora do compartimento tilacóide em direção ao estroma. Várias enzimas do estroma evoluíram para tomar vantagem dessas condições dependentes de luz que sinalizam a disponibilidade de ATP e NADPH; eles têm pH ou concentração de Mg^{2+} ótimos que são mais bem

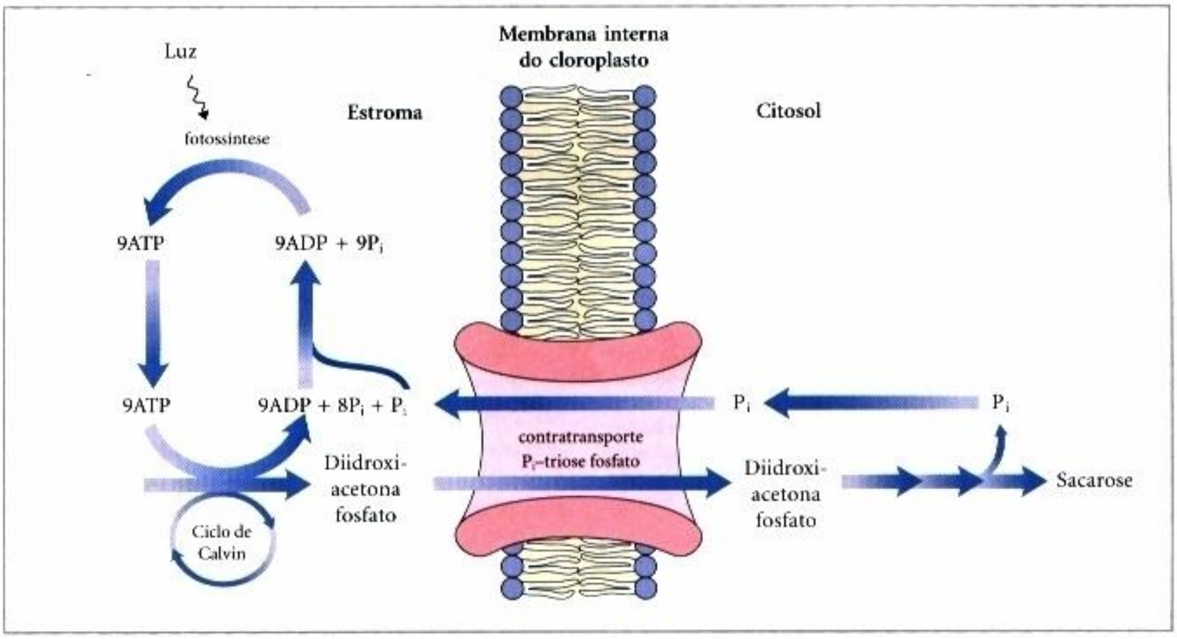

Membrana interna do cloroplasto
Luz
fotossíntese
Estroma
Citosol
9ATP
9ADP + 9P$_i$
9ATP
9ADP + 8P$_i$ + P$_i$
contratransporte P$_i$–triose fosfato
P$_i$
P$_i$
Diidroxi-acetona fosfato
Diidroxi-acetona fosfato
Sacarose
Ciclo de Calvin

Figura 20-31 – O sistema contratransporte P_i–triose fosfato da membrana interna do cloroplasto. Este transportador facilita a troca do P_i citosólico por diidroxiacetona fosfato estromal. Os produtos da assimilação fotossintética do carbono são, portanto, movidos para o citosol, onde eles funcionam como ponto de partida para a biossíntese da sacarose e o fosfato necessário para a fotofosforilação é transferido para o estroma. Esse contratransporte pode conduzir o 3-fosfoglicerato e agir no transportador para exportação de ATP e equivalentes redutores (veja Fig. 20-32).

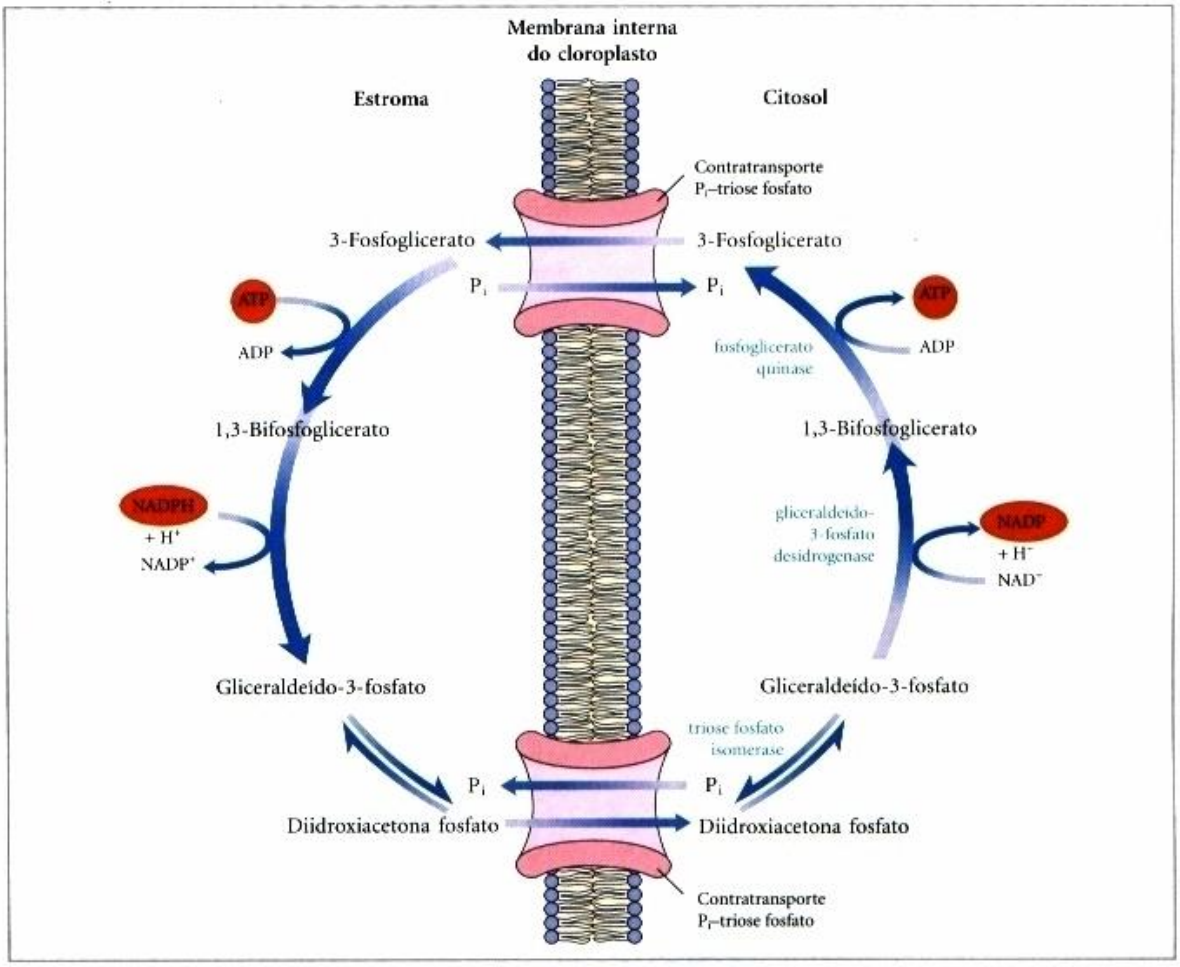

Membrana interna do cloroplasto
Estroma
Citosol
Contratransporte P$_i$–triose fosfato
3-Fosfoglicerato
3-Fosfoglicerato
P$_i$
P$_i$
ATP
ADP
ATP
ADP
fosfoglicerato quinase
1,3-Bifosfoglicerato
1,3-Bifosfoglicerato
NADPH + H$^+$
NADP$^+$
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
NADP + H$^-$
NAD$^-$
Gliceraldeído-3-fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
triose fosfato isomerase
P$_i$
P$_i$
Diidroxiacetona fosfato
Diidroxiacetona fosfato
Contratransporte P$_i$–triose fosfato

Figura 20-32 – Papel do contratransporte P_i–triose fosfato no transporte do ATP e de equivalentes redutores. A diidroxiacetona fosfato deixa o cloroplasto e é convertida em gliceraldeído-3-fosfato no citosol. A atividade das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do citosol e da fosfoglicerato quinase produzem então NADH, ATP e o 3-fosfoglicerato, que reentra no cloroplasto e é reduzido a diidroxiacetona fosfato no estroma, completando um ciclo que transporta de forma efetiva para fora do cloroplasto o ATP e equivalentes redutores (NADPH/NADH).

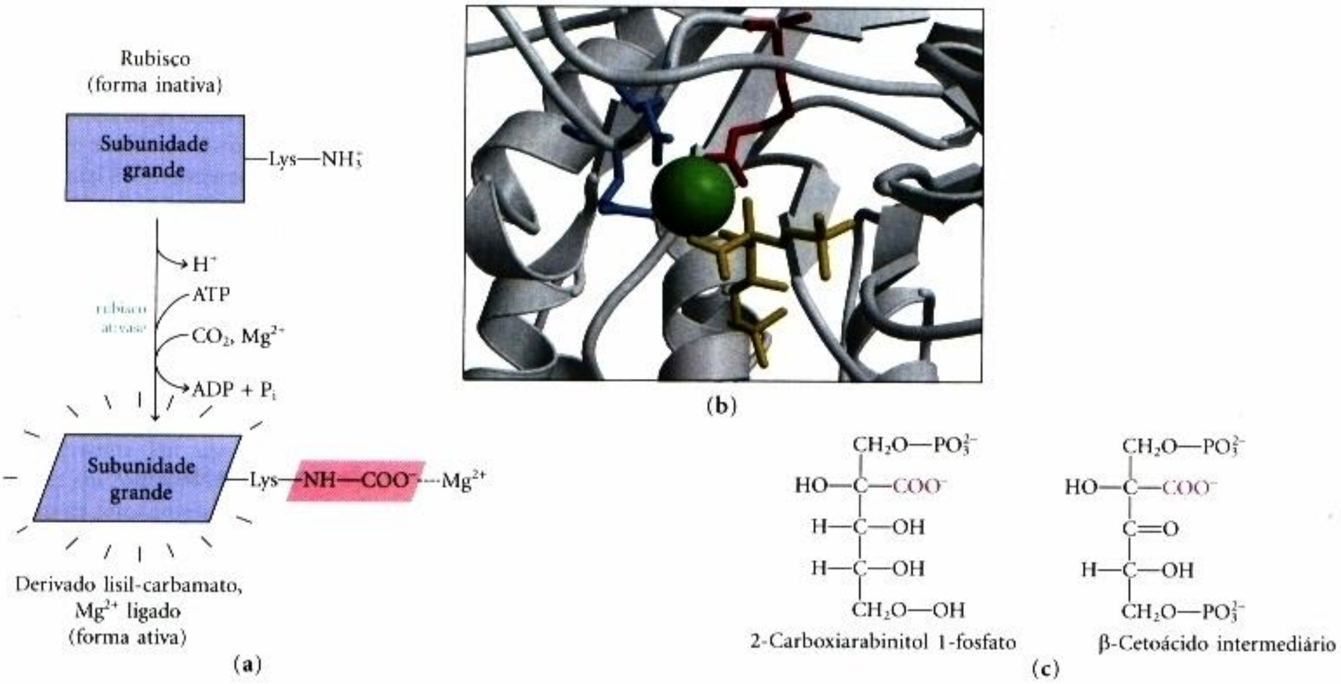

Rubisco
(forma inativa)
Subunidade grande
Lys—NH$_3^+$
H$^+$
ATP
rubisco ativase
CO$_2$, Mg^{2+}
ADP + P$_i$
Subunidade grande
Lys—NH—COO$^-$---Mg^{2+}
Derivado lisil-carbamato,
Mg^{2+} ligado
(forma ativa)
(a)
(b)
CH$_2$O—PO$_3^{2-}$
HO—C—COO$^-$
H—C—OH
H—C—OH
CH$_2$O—OH
2-Carboxiarabinitol 1-fosfato
CH$_2$O—PO$_3^{2-}$
HO—C—COO$^-$
C=O
H—C—OH
CH$_2$O—PO$_3^{2-}$
β-Cetoácido intermediário
(c)

Figura 20-33 – Regulação da rubisco. (**a**) A ativação da rubisco por formação de um derivado carbamato de um resíduo de lisina existente no sítio ativo. A reação é catalisada pela enzima rubisco ativase. (**b**) O sítio ativo da rubisco da bactéria *Rhodospirillum rubrum*. Nesta figura o sítio que liga o substrato está ocupado por um inibidor, o 2-carboxi-D-arabinitol 1,5-bifosfato (em amarelo), que foi cristalizado junto com a enzima. As cadeias laterais dos aminoácidos que interagem com o inibidor ligado estão em azul. O resíduo de lisina carbamilado está em vermelho e a esfera verde é um íon Mg^{2+} no sítio ativo. (**c**) O análogo do estado de transição que ocorre naturalmente, 2-carboxiarabinitol 1-fosfato, é comparado aqui com o intermediário β-cetoácido (veja Fig. 20-23) da reação da rubisco. Este análogo é muito semelhante ao inibidor mostrado ligado à enzima em (**b**).

adaptados para as condições alcalinas e alta concentração de Mg^{2+}. A ativação da rubisco pela formação de carbamato de lisina é mais rápida em pH alcalino, e altas concentrações no estroma de Mg^{2+} favorecem a formação do complexo ativo com o Mg^{2+}. A frutose-1,6-bifosfatase requer Mg^{2+} e é muito dependente do pH (Fig. 20-35). A sua atividade aumenta mais de cem vezes quando o pH e a concentração de Mg^{2+} aumentam durante a iluminação do cloroplasto.

Quatro enzimas essenciais para a operação do ciclo de Calvin são submetidas a outro tipo de regulação pela luz. As enzimas, ribulose-5-fosfato quinase, frutose-1,6-bifosfatase, sedoeptulose-1,7-bifosfatase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogena-

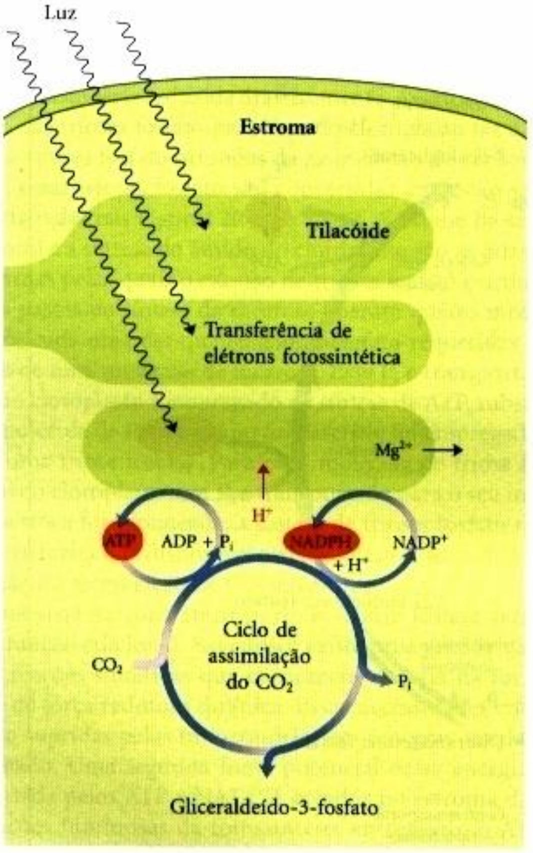

Luz
Estroma
Tilacóide
Transferência de
elétrons fotossintética
Mg^{2+}
H$^+$
ATP
ADP + P$_i$
NADPH
NADP$^+$
+ H$^+$
Ciclo de
assimilação
do CO$_2$
CO$_2$
P$_i$
Gliceraldeído-3-fosfato

Figura 20-34 – O ATP e o NADPH produzidos pelas reações luminosas são substratos essenciais para a redução do CO$_2$. As fotorreações que produzem ATP e NADPH são acompanhadas por movimentos de prótons (vermelho) do estroma para o tilacóide, criando condições alcalinas no estroma. Os íons Mg^{2+} passam do tilacóide para o estroma, aumentando a concentração deles nesse local.

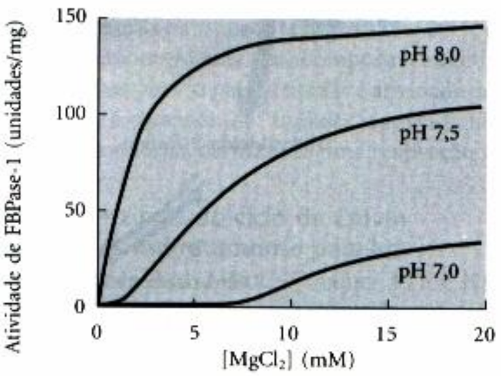


Figura 20-35 – A ativação da frutose-1,6-bifosfatase do cloroplasto. A frutose-1,6-bifosfatase reduzida (FBPase-1) é ativada pela luz e pela combinação de pH alto e alta concentração de [Mg^{2+}] no estroma, sendo as duas situações produzidas pela iluminação.

se, são ativadas por redução induzida pela luz de ligações dissulfeto entre dois resíduos de cisteína críticos para as respectivas atividades catalíticas. Quando esses resíduos de cisteína são oxidados como pontes dissulfeto, as enzimas tornam-se inativas; essa é a situação normal no escuro. Com a iluminação, os elétrons fluem do fotossistema I para a ferredoxina (veja Fig. 19-46), a qual passa os elétrons para uma proteína pequena e solúvel que contém grupos dissulfeto chamada **tiorredoxina** (Fig. 20-36). A tiorredoxina fornece os seus elétrons para a redução das pontes dissulfeto dessas enzimas ativadas pela luz e, a seguir, é reativada em uma reação de troca de dissulfetos catalisada pela **tiorredoxina redutase**. Fora do cloroplasto as tiorredoxinas participam de uma variedade de outros processo de oxirredução (veja Fig. 22-37). Quando anoitece, os resíduos de cisteína são reoxidados em suas formas dissulfeto, as quatro enzimas são inativadas e o ATP não é gasto na assimilação do CO_2; entretanto, o amido sintetizado e armazenado durante o dia é quebrado para fornecer moléculas de glicose para a glicólise.

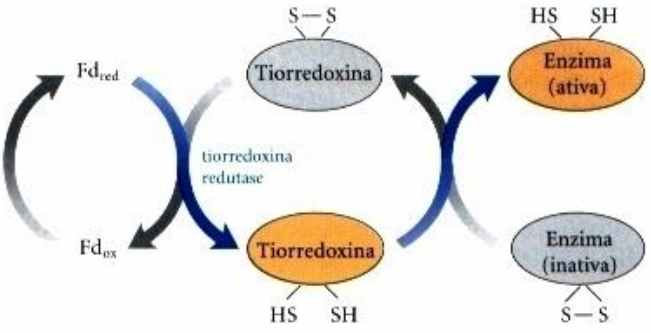


Figura 20-36 – Tiorredoxina. A ativação pela luz de várias enzimas do ciclo de Calvin é mediada pela tiorredoxina, uma pequena proteína contendo grupos dissulfeto. Na luz, a tiorredoxina é reduzida por elétrons da ferredoxina (Fd) (setas azuis) e, por sua vez, reduz ligações dissulfeto críticas nas moléculas da sedoeptulose-1,7-bifosfatase, frutose-1,6-bifosfatase, da ribulose-5-fosfato quinase e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, essa modificação ativa essas enzimas.

Nos vegetais o emprego das trioses fosfato para a síntese de sacarose e de amido é estreitamente regulado

Na maioria das células vegetais, as trioses fosfato produzidas pelo ciclo de Calvin durante a exposição à luz solar podem ser temporariamente armazenadas como amido no cloroplasto ou convertidas em sacarose, que é exportada para as partes não fotossintetizadoras da planta, ou, ainda, ter ambos os destinos. O equilíbrio entre esses processos é regulado rigidamente e ambos precisam ser coordenados com a velocidade de assimilação do carbono. Cinco sextos das trioses fosfato formadas no ciclo de Calvin precisam ser recicladas em ribulose-5-fosfato; caso mais de um sexto das trioses fosfato for drenado para fora do ciclo para fazer sacarose e amido, o ciclo terá sua velocidade diminuída, podendo mesmo parar. Por outro lado, a conversão insuficiente das trioses fosfato em amido ou sacarose pode seqüestrar o fosfato, deixando o cloroplasto deficiente em P_i, que também é essencial para a operação do ciclo de Calvin.

A frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) e a enzima que reverte sua ação, a fosfofrutoquinase PP_i-dependente (PP-PFK-1, veja pág. 413), controlam o fluxo das trioses fosfato em sacarose e são, portanto, pontos críticos de regulação do destino das trioses fosfato produzidas pela fotossíntese. Ambas as enzimas são reguladas pela frutose-2,6-bifosfato, que inibe a FBPase-1 e estimula a PP-PFK-1. Nos vegetais superiores a concentração da frutose-2,6-bifosfato varia inversamente à velocidade da fotossíntese (Fig. 20-37). A fosfofrutoquinase-2, responsável pela síntese da frutose-2,6-bifosfato, é inibida pela diidroxiacetona fosfato ou 3-fosfoglicerato e estimulada pela frutose-6-fosfato e P_i. Quando a fotossíntese está ativa, a diidroxiacetona fosfato é produzida e o P_i consumido, resultando em inibição da PFK-2 e níveis diminuídos de frutose-2,6-bifosfato. Isso favorece um fluxo maior de trioses fosfato para a formação de frutose-6-fosfato e a síntese de sacarose. Com esse sistema de regulação, a síntese da sacarose ocorre apenas quando o nível de trioses fosfato produzidas pelo ciclo de Calvin excede aquele necessário para manter o ciclo em operação.

A síntese da sacarose é regulada também no nível da sacarose-6-fosfato sintase, que é ativada por glicose-6-fosfato e inibida por P_i. Durante a fotossíntese ativa, as trioses fosfato são convertidas em frutose-6-fosfato, que é rapidamente equilibrada com a glicose-6-fosfato pela fosfoexose isomerase. Como o equilíbrio está deslocado fortemente para o lado da glicose-6-fosfato, logo que a frutose-6-fosfato se acumula, o nível de glicose-6-

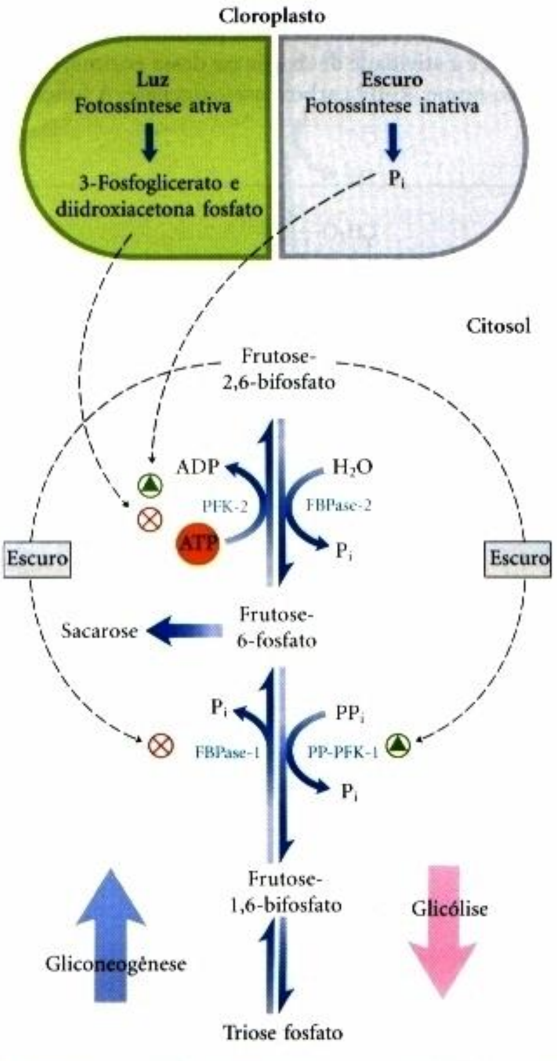


Figura 20-37 – A frutose-2,6-bifosfato como reguladora da síntese da sacarose. A concentração do regulador alostérico frutose-2,6-bifosfato em células vegetais é controlada pelos produtos derivados do carbono fixado fotossinteticamente e por P_i. A diidroxiacetona fosfato e o 3-fosfoglicerato produzidos pela assimilação do CO_2 inibem a fosfofrutoquinase-2 (PFK-2), a enzima que sintetiza o regulador; o P_i estimula essa enzima. A concentração do regulador é, portanto, inversamente proporcional à velocidade da fotossíntese. No escuro, a concentração de frutose-2,6-bifosfato aumenta e estimula a enzima glicolítica dependente de PP_i, a fosfofrutoquinase-1 (PFK-1), enquanto inibe a enzima gliconeogênica frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1). Quando a fotossíntese está ativa (existe luz), a concentração desse regulador cai e favorece a síntese da frutose-6-fosfato e da sacarose.

fosfato aumenta e a síntese da sacarose é estimulada. A sacarose-6-fosfato sintase também é regulada por modificação covalente (fosforilação) em resposta à sinalização luz-escuro. No escuro a enzima é fosforilada em um resíduo de serina produzindo sua forma menos ativa. A proteína fosfatase que remove o fosfato, ativando a enzima, é, ela mesma, ativada pela luz, o mecanismo disso não é, ainda, claro.

A enzima-chave reguladora da síntese de amido é a ADP-glicose pirofosforilase (Fig. 20-16), a qual é ativada pelo 3-fosfoglicerato e inibida por P_i. Quando a síntese da sacarose diminui, o 3-fosfoglicerato formado pela fixação do CO_2 se acumula e ativa essa enzima, o que estimula a síntese do amido.

A fotorrespiração resulta da atividade oxigenase da rubisco

A especificidade da rubisco para o CO_2 como substrato não é absoluta; o O_2 compete com o CO_2 pelo sítio ativo; a rubisco catalisa, também, a condensação de O_2 com ribulose-1,5-bifosfato, para formar uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de **fosfoglicolato** (Fig. 20-38), um produto metabolicamente inútil. Essa é a atividade de oxigenase dessa enzima, evidenciada em seu nome: RuBP carboxilase/oxigenase. A função metabólica dessa reação não é clara. Ela não resulta em qualquer assimilação de carbono e parece representar um prejuízo final para a célula na qual ocorre; o fosfoglicolato não é um metabólito útil e recuperar os seus carbonos (pela via descrita mais adiante) consome energia celular. A condensação de O_2 com a ribulose-1,5-bifosfato ocorre de maneira concorrente com a assimilação de CO_2, com a última predominando por um fator próximo a 3.

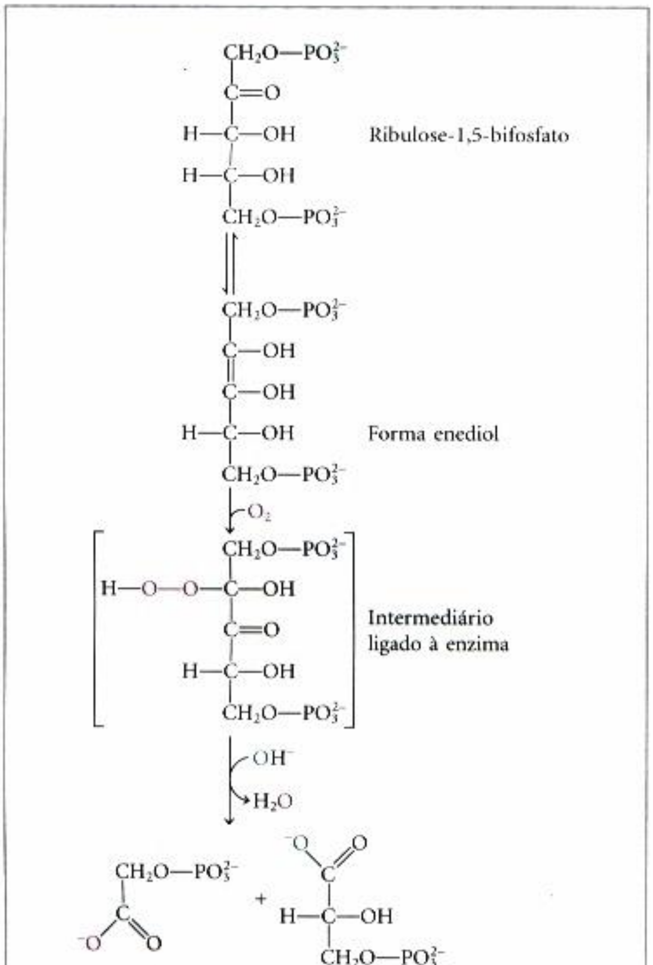


Figura 20-38 – A atividade de oxigenase da rubisco. A rubisco pode incorporar O_2 em lugar de CO_2 na ribulose-1,5-bifosfato. O intermediário instável assim formado se divide em fosfoglicolato, o qual é reciclado como descrito na Figura 20-39, e em 3-fosfoglicerato, que pode reentrar no ciclo de Calvin.

Aparentemente, a evolução da rubisco dotou-a com um sítio ativo que não é capaz de discriminar suficientemente bem entre CO_2 e O_2, talvez porque a maior parte dessa evolução tenha ocorrido antes que o O_2 fosse um componente importante da atmosfera da Terra. O valor de K_m para o CO_2 é perto de 9μM e para o O_2 está perto de 350μM (uma solução que está em equilíbrio com o ar na temperatura ambiente contém perto de 11μM de CO_2 e 250μM de O_2). A nossa atmosfera atual contém perto de 20% de O_2 e apenas 0,04% de CO_2, proporções que permitem que a "assimilação" de O_2 pela rubisco represente um significativo desperdício de energia. Durante a fotossíntese, o CO_2 é consumido nas reações de assimilação, alterando a relação de CO_2 para O_2 nos espaços ao redor da folha em favor de O_2. Além disso, a afinidade da rubisco em relação ao CO_2 diminui com o aumento da temperatura, exacerbando a tendência da enzima para catalisar a improdutiva reação de oxigenase.

A via que recupera os carbonos do fosfoglicolato, chamada via do glicolato (Fig. 20-39), envolve a conversão de duas moléculas de fosfoglicolato em uma molécula de serina (três carbonos) e uma molécula de CO_2. A atividade de oxigenase da rubisco combinada com a via de recuperação consome O_2 e produz CO_2 — daí o nome de **fotorrespiração.** Diferentemente da respiração mitocondrial, esse processo não conserva energia. A fotorrespiração pode inibir a formação da biomassa em até 50%. Isso levou a algumas adaptações no processo pelo qual a assimilação do carbono ocorre, particularmente nas plantas que evoluíram em climas quentes.

Algumas plantas possuem um mecanismo para minimizar a fotorrespiração

A maior parte das plantas tropicais, bem como as plantas de cultivo agrícola da zona temperada mas originárias dos trópicos, como o milho, a cana-de-açúcar e o sorgo, desenvolveram um mecanismo para evitar o problema da fotorrespiração desperdiçadora de energia. O passo no qual ocorre a assimilação do CO_2 em um produto de três átomos de carbono, 3-fosfoglicerato, é precedido por vários passos e, em um deles, ocorre a fixação temporária de CO_2 em um composto com quatro átomos de carbono. Essas plantas são chamadas de **vegetais C_4**, e o processo de assimilação de metabolismo C_4 ou de via C_4. Os vegetais nos quais o *primeiro passo* na assimilação do carbono é a reação do CO_2 com a ribulose-1,5-bifosfato para formar 3-fosfoglicerato — como já descrevemos — são chamados de **vegetais C_3**.

Os vegetais C_4, que tipicamente crescem em ambientes com temperaturas e intensidades luminosas altas, apresentam várias características importantes: altas velocidades fotossintéticas, altas velocidades de crescimento, velocidade de fotorrespiração baixa, velocidade baixa de perda de água e folhas com uma estrutura incomum. A fotossíntese nas folhas das plantas C_4 envolve dois tipos celulares: células mesofílicas e células envoltórias do feixe vascular (Fig. 20-40). Existem três padrões conhecidos de metabolismo C_4. A via mais bem conhecida, descoberta e estudada na década de 1960 por dois bioquímicos de vegetais, Marshall Hatch e Rodger Slack, está descrita adiante (Fig. 20-40b).

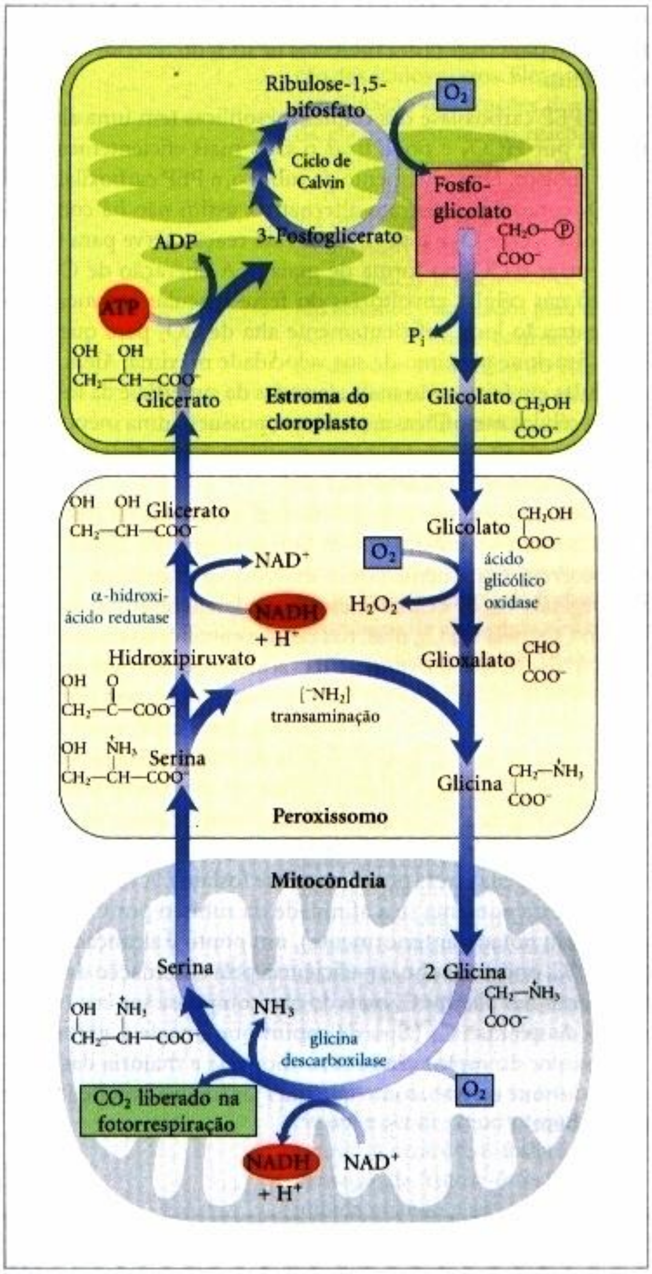
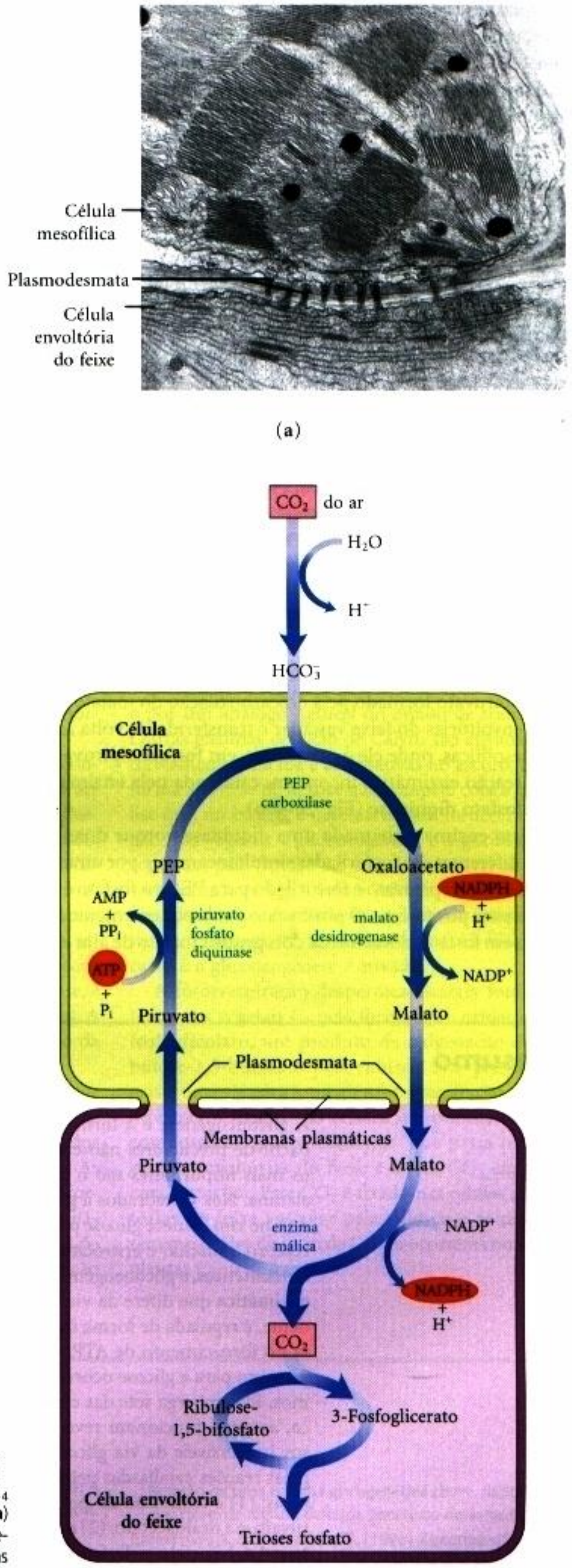

Ribulose-1,5-bifosfato
O_2
Ciclo de Calvin
Fosfo-glicolato
CH_2O—Ⓟ
COO^-
ADP
3-Fosfoglicerato
ATP
P_i
OH OH
CH_2—CH—COO^-
Glicerato
Estroma do cloroplasto
Glicolato CH_2OH COO^-
OH OH Glicerato
CH_2—CH—COO^-
Glicolato CH_2OH COO^-
NAD^+
O_2
ácido glicólico oxidase
α-hidroxi-ácido redutase
NADH + H^+
H_2O_2
Hidroxipiruvato
Glioxalato CHO COO^-
OH O
CH_2—C—COO^-
[$^-NH_2$] transaminação
OH $\overset{+}{N}H_3$ Serina
CH_2—CH—COO^-
Glicina CH_2—$\overset{+}{N}H_3$ COO^-
Peroxissomo
Mitocôndria
Serina
2 Glicina
CH_2—$\overset{+}{N}H_3$ COO^-
OH $\overset{+}{N}H_3$
CH_2—CH—COO^-
NH_3
glicina descarboxilase
CO_2 liberado na fotorrespiração
O_2
NADH + H^+
NAD^+

Figura 20-39 – Via do glicolato. A via pela qual o fosfoglicolato (sombreado em vermelho) formado durante a fotorrespiração é conservado pela conversão em serina e depois em 3-fosfoglicerato envolve três compartimentos celulares. O glicolato formado por desfosforilação do fosfoglicolato nos cloroplastos é transaminado em glicina nos peroxissomos. Nas mitocôndrias, duas moléculas de glicina se condensam para formar serina e o CO_2 liberado durante a fotorrespiração (sombreado em verde). Essa reação é catalisada pela glicina descarboxilase, uma enzima presente em níveis muito altos na mitocôndria das plantas C_3 (veja texto). A serina é convertida em hidroxipiruvato e depois em glicerato nos peroxissomos, então o glicerato reentra nos cloroplastos para ser fosforilado, reunindo-se ao ciclo de Calvin. O oxigênio é consumido em três passos da fotorrespiração (sombreado em azul).


Célula mesofílica
Plasmodesmata
Célula envoltória do feixe
(a)
CO_2 do ar
H_2O
H^+
HCO_3^-
Célula mesofílica
PEP carboxilase
PEP
Oxaloacetato
AMP + PP_i
piruvato fosfato diquinase
ATP + P_i
malato desidrogenase
NADPH + H^+
$NADP^+$
Piruvato
Malato
Plasmodesmata
Membranas plasmáticas
Piruvato
Malato
enzima málica
$NADP^+$
NADPH + H^+
CO_2
Ribulose-1,5-bifosfato
3-Fosfoglicerato
Célula envoltória do feixe
Trioses fosfato
(b)

▶

Figura 20-40 – A assimilação do carbono nas plantas C_4. A via C_4 envolve as células mesofílicas e as células envoltórias do feixe vascular. (**a**) Uma microfotografia eletrônica mostrando os cloroplastos das células mesofílicas e das células envoltórias do feixe vascular adjacentes. As células envoltórias do feixe contêm grânulos de amido. O plasmodesmata que liga as duas células é evidente. (**b**) A via de Hatch-Slack promove a assimilação do CO_2 por meio de um intermediário de quatro átomos de carbono.

Nas plantas de origem tropical, o primeiro intermediário no qual $^{14}CO_2$ é fixado não é o 3-fosfoglicerato mas o oxaloacetato, um composto com quatro átomos de carbono. Essa reação, que ocorre no citosol das células mesofílicas das folhas, é catalisada pela **fosfoenolpiruvato carboxilase**. O oxaloacetato assim formado ou é reduzido a malato com consumo de NADPH (como mostrado na Fig. 20-40b) ou convertido em aspartato por transaminação:

$$\text{Oxaloacetato} + \alpha\text{-aminoácido} \longrightarrow \text{L-aspartato} + \alpha\text{-cetoácido}$$

O malato ou o aspartato formado nas células mesofílicas que contém o CO_2 fixado é transferido para as células envoltórias do feixe vascular próximas por meio de junções especiais (plasmodesmata; veja Fig. 2-22) entre as células. Nas células envoltórias do feixe vascular, o malato é oxidado e descarboxilado para liberar piruvato e CO_2 pela ação da **enzima málica**, reduzindo $NADP^+$. Nas plantas que empregam o aspartato como transportador de CO_2, o aspartato é primeiro transaminado para formar o oxaloacetato, que é reduzido a malato nas células envoltórias do feixe vascular e, a seguir, libera o CO_2 pela ação da enzima málica. O CO_2 livre formado nas células envoltórias do feixe vascular é a mesma molécula de CO_2 que foi originalmente fixada no oxaloacetato no interior das células mesofílicas. Nas células envoltórias do feixe vascular, o CO_2 proveniente da descarboxilação do malato é novamente fixado, dessa vez pela rubisco, exatamente na mesma reação que ocorre nos vegetais C_3, levando à incorporação de CO_2 no C-1 do 3-fosfoglicerato.

O piruvato formado pela descarboxilação do malato nas células envoltórias do feixe vascular é transferido de volta às células mesofílicas, onde ele é convertido em fosfoenolpiruvato por uma reação enzimática incomum, catalisada pela enzima **piruvato fosfato diquinase** (Fig. 20-40b).

Essa enzima é chamada uma diquinase porque duas moléculas diferentes são fosforiladas simultaneamente por uma molécula de ATP: o piruvato é fosforilado para PEP e o fosfato é fosforilado para pirofosfato. O pirofosfato é subseqüentemente hidrolisado em fosfato, dessa forma dois grupos fosfato de alta energia do ATP são empregados na regeneração do PEP. O PEP está agora pronto para fixar outra molécula de CO_2 no interior da célula mesofílica.

A PEP carboxilase das células mesofílicas tem uma alta afinidade por HCO_3^- e pode fixar o CO_2 mais eficientemente do que a rubisco. Diferentemente da rubisco, a PEP carboxilase não usa O_2 como um substrato alternativo, assim não há competição entre CO_2 e O_2 e essa enzima. Essa reação serve para fixar e concentrar o CO_2 na forma de malato. A liberação de CO_2 do malato nas células envoltórias do feixe vascular provoca uma concentração local suficientemente alta de CO_2 para que a rubisco funcione próximo de sua velocidade máxima. Além disso, as células em feixe estão mais afastadas da superfície da folha do que as células mesofílicas e, portanto, possuem uma menor concentração de O_2. Esses fatores minimizam a atividade de oxigenase da rubisco nas plantas C_4.

Uma vez fixado o CO_2 no 3-fosfoglicerato nas células envoltórias do feixe vascular, todas as outras reações do ciclo de Calvin ocorrem exatamente como descrito anteriormente. Assim, nos vegetais C_4, as células mesofílicas desenvolvem a assimilação do CO_2 pela via C_4, mas, nas células envoltórias do feixe vascular, a biossíntese do amido e da sacarose ocorre pela via C_3.

A via de assimilação do CO_2 nos vegetais C_4 tem um custo energético maior que nos vegetais C_3. Para cada molécula de CO_2 fixada na via C_4, uma molécula de PEP precisa ser regenerada ao custo de dois grupos fosfato de alta energia do ATP. Assim, os vegetais C_4 precisam de um total de cinco moléculas de ATP para fixar uma molécula de CO_2, enquanto os vegetais C_3 gastam apenas três (nove por triose fosfato). À medida que a temperatura aumenta (e a afinidade da rubisco por CO_2 diminui, como notado anteriormente), um ponto é alcançado entre 28 e 30°C, onde o ganho em eficiência pela eliminação da fotorrespiração nas plantas C_4 mais do que compensa seu custo energético. As plantas C_4 (tipo de capim que invade a grama dos jardins, por exemplo) crescem melhor que a maioria das plantas C_3 durante o verão, como qualquer jardineiro experiente sabe muito bem!

Resumo

A gliconeogênese é a formação de carboidratos a partir de precursores não-carboidratos, dos quais, os mais importantes são o piruvato, o lactato e a alanina. Nos vertebrados a gliconeogênese no fígado e no rim fornece glicose para ser consumida pelo cérebro, músculo e eritrócitos. Como todas as vias biossintéticas, a gliconeogênese ocorre por uma rota enzimática que difere da via catabólica correspondente, é regulada de forma independente e necessita do fornecimento de ATP. A via biossintética do piruvato para a glicose ocorre em todos os organismos. Ela emprega sete das enzimas da via glicolítica, as quais funcionam reversivelmente. Três passos irreversíveis da via glicolítica são contornados pelas reações catalisadas pelas enzimas gliconeogênicas: (1) a conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato via oxaloacetato; (2) a desfosforilação da frutose-1,6-bifosfato pela frutose-1,6-bifosfatase; (3) a desfosforilação da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfatase. A via de piruvato até fosfoenolpiruvato depende do precursor gliconeogênico ser o lactato ou o próprio piruvato. A formação de uma molécula de glicose a partir do piruvato requer quatro moléculas de ATP e duas de GTP. Três átomos de carbono de cada um dos intermediários do ciclo do ácido cítrico e algum ou todos os carbonos de muitos dos aminoácidos podem ser transformados em glicose.

A gliconeogênese no fígado é regulada em dois pontos principais: (1) a carboxilação do piruvato pela piruvato carboxilase, a qual é estimulada pelo efetor alostérico acetil-CoA; e (2) a desfosforilação da frutose-1,6-bifosfato pela frutose-1,6-bifosfatase, que é inibida por frutose-2,6-bifosfato e por AMP e estimulada por citrato. A frutose-2,6-bifosfato também estimula a enzima glicolítica fosfofrutoquinase-1 e é crucial para o equilíbrio entre gliconeogênese e glicólise. Nos animais, os níveis de frutose-2,6-bifosfato são regulados por hormônios. A regulação recíproca da gliconeogênese e da glicólise evita ciclos fúteis com conseqüente perda de energia na forma de ATP.

Diferentemente dos animais, os vegetais podem converter em glicose o acetil-CoA derivado da oxidação dos ácidos graxos. Eles podem fazer isso por uma combinação das reações dos ciclos do glioxalato e da gliconeogênese, em reações compartimentalizadas entre os glioxissomos, mitocôndrias e citosol.

A síntese do glicogênio também ocorre por uma via diferente da sua quebra. Ela requer a conversão da glicose-1-fosfato em UDP-glicose, um conjugado de açúcar e nucleotídeo. Os fosfatos de açúcar são ativados e marcados para uma dada via sintética por meio da união com um nucleosídeo difosfato no carbono anomérico do açúcar. A glicogênio sintase adiciona unidades de glicose da UDP-glicose à ponta não-redutora da cadeia de glicogênio em crescimento, formando ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$). Uma enzima de ramificação, a glicosil-($4 \rightarrow 6$)-transferase, é necessária para criar os pontos de ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$). O início da síntese do glicogênio requer a glicogenina. A síntese e a quebra do glicogênio são reguladas reciprocamente pela fosforilação dependente de hormônios da glicogênio sintase (o que a inativa) e da glicogênio fosforilase (o que a ativa).

A síntese da lactose na glândula mamária em lactação é realizada pelo complexo enzimático α-lactalbumina–galactosil transferase (lactose sintase), que emprega a glicose e a UDP-glicose como substratos. A α-lactalbumina funciona como uma subunidade modificadora da especificidade enzimática do conjunto e sua síntese é regulada pelos hormônios que promovem a lactação.

Nos vegetais, as trioses fosfato podem ser condensadas em hexoses fosfato e polimerizadas até amido para ser estocadas no interior dos cloroplastos. A amido sintase catalisa a adição de unidades de glicose da ADP-glicose ao amido por um mecanismo similar àquele da glicogênio sintase. Alternativamente, as trioses fosfato podem passar para o citosol e servir como precursores na síntese da sacarose. A sacarose-6-fosfato sintase, que faz a condensação da frutose-6-fosfato com a UDP-glicose, é inibida quando a sacarose se acumula no citosol. A síntese de amido é estimulada pela acumulação da sacarose.

Nas células vegetais a fotossíntese ocorre nos cloroplastos. Nas reações da fotossíntese fixadoras de CO_2 (o ciclo de Calvin), ATP e NADPH são usados para reduzir o CO_2 para formar trioses fosfato. As reações necessárias para assimilação do CO_2 ocorrem em três estágios: a própria reação de assimilação catalisada pela enzima estromal ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco); a redução do 3-fosfoglicerato resultante em gliceraldeído-3-fosfato, que pode ser empregado ou na síntese de hexoses, sacarose e amido ou na glicólise; e a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato a partir das trioses fosfato.

A rubisco condensa o CO_2 com a ribulose-1,5-bifosfato e, a seguir, hidrolisa a hexose resultante em duas moléculas de 3-fosfoglicerato. As isoenzimas estromais das enzimas glicolíticas catalisam a redução do 3-fosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato; cada molécula que é reduzida requer um ATP e um NADPH. Finalmente, as enzimas estromais, incluindo a transcetolase e a transaldolase, rearranjam os esqueletos carbônicos das trioses fosfato, gerando uma série de intermediários com três, quatro, cinco, seis e sete carbonos, liberando, ao final, pentose fosfato. As pentoses fosfato são convertidas em ribulose-5-fosfato e esta é fosforilada em ribulose-1,5-bifosfato para completar o ciclo de Calvin. O custo energético da assimilação de três CO_2 em trioses fosfato é igual a nove ATP e seis NADPH.

Um sistema contratransporte na face interna da membrana do cloroplasto troca P_i do citosol por 3-fosfoglicerato ou diidroxiacetona fosfato produzido pela assimilação do CO_2 no estroma. A oxidação da diidroxiacetona fosfato no citosol gera ATP e NADH, movendo o ATP e equivalentes redutores do cloroplasto para o citosol.

A rubisco é regulada por modificação covalente e por um análogo natural do estado de transição. Outras enzimas do ciclo de Calvin são ativadas indiretamente pela luz e são inativas no escuro, dessa forma a síntese de hexose não compete com a glicólise que, no escuro, é necessária para fornecer energia. Nos vegetais a gliconeogênese e a glicólise são reguladas pela frutose-2,6-bifosfato, o nível da qual varia inversamente à velocidade da fotossíntese: à medida que a velocidade dos processos fotossintéticos aumentam, os níveis de frutose-2,6-bifosfato caem e a gliconeogênese é ativada.

A fotorrespiração desperdiça energia fotossintética nos vegetais C_3 pela formação e oxidação do fosfoglicolato, um produto da oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato pela rubisco. Nas plantas C_4 existe uma via para impedir a fotorrespiração; o CO_2 é primeiro fixado nas células mesofílicas em um composto de quatro carbonos, que passa para as células envoltórias do feixe e libera CO_2 em altas concentrações. Esse CO_2 é fixado nas células envoltórias do feixe vascular pela rubisco e as reações remanescentes do ciclo de Calvin ocorrem como nas plantas C_3.

Leitura Adicional

Gliconeogênese

Gleeson T. (1996) Post-exercise lactate metabolism: a comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 565-581.

Hers HG & Hue L. (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 617-653.

Jitrapakdee S & Wallace JC. (1999) Structure, function, and regulation of pyruvate carboxilase. *Biochem. J.* **340**, 1-16.

Revisão de uma enzima glicogenética chave, inclui uma descrição de alguns defeitos genéticos dessa enzima.

Jungerman K & Kietzmann T. (1996) Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 179-203.

Algumas informações adicionais sobre as funções do fígado.

Matte A, Tari LW, Goldie H, & Delbaere LTJ. (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpiruvate carboxikinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105-8108.

Nordlie RC, Foster JD, & Lange AJ. (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 379-406.

Revisão com atenção especial na regulação de curto e longo prazo da glicose-6-fosfatase e da glicoquinase.

Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, & Claus TH. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 755-783.

Síntese dos polissacarídeos

Ball S, Guan H-P, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buléon A, Colonna P, & Preiss J. (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**, 349-352.

Beck E & Ziegler P. (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 95-117.

Leloir LF. (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* **172**, 1299-1303.

A conferência de recepção do Prêmio Nobel de Leloir, incluindo uma discussão sobre o papel metabólico dos complexos açúcar-nucleotídeos.

Nuttall FQ, Gilboe DP, Gannon MC, Niewoehner CB, & Tan AWH. (1988) Regulation of glycogen synthesis in the liver. *Am. J. Med.* **85**, Supplement 5A, 77-85.

Preiss J & Romeo T. (1994) Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **47**, 299-329.

Roach P & Skurat A. (1997) Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **57**, 289-316.

Assimilação do dióxido de carbono

Andersson I, Knight S, Schneider G, Lindqvist Y, Lundqvist T, Brändén CI, & Lorimer GH. (1989) Crystal structure of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase. *Nature* **337**, 229-234.

Cleland WW, Andrews TJ, Gutteridge S, Hartman FC, & Lorimer GH. (1998) Mechanism of rubisco – the carbamate as general base. *Chem. Rev.* **98**, 549-561.

Uma revisão com especial atenção para o carbamato no sítio ativo.

Douce R & Neuberger M. (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 214-222.

Flügge UI. (1999) Phosphate translocaters in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 27-45.

Revisão dos transportadores que levam P_i e vários açúcares fosfatados através das membranas dos plastídeos.

Hartman FC & Harpel MR. (1994) Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 197-234.

Heldt H-W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, New York.

Horecker BL. (1976) Unravelling the pentose phosphate pathway. In *Reflections on Biochemistry* (Kornberg A, Cornudella L, Horecker BL & Oro J eds), pp. 65-72, Pergamon Press, Inc., Oxford.

Huber SC & Huber JL. (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 431-444.

Portis AR Jr. (1990) Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 15-28.

Schneider G, Lindqvist Y, Brändén CI, & Lorimer G. (1986) Three-dimensional structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* at 2.9Å resolution. *EMBO J.* **5**, 3409-3415.

Smith AM, Denyer K, & Martin C. (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 67-87.

Revisão do papel da ADP-glicose pirofosforilase na síntese da amilose e da amilopectina dos grânulos de amido.

Stitt M. (1990) Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 153-185.

Stitt M. (1995) Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 341-368.

Revisão das abordagens genéticas para definir pontos de regulação *in vivo*.

Tabita FR. (1999) Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. *Photosynth. Res.* **60**, 1-28.

Wolosiuk R, Ballicora M, & Hagelin K. (1993) The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO_2 assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* **7**, 622-637.

Wood T. (1985) *The Pentose Phosphate Pathway*, Academic Press, Inc., Orlando, FL.

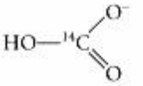
Woodrow LE & Berry JA. (1988) Enzymatic regulation of photosynthetic CO_2 fixation in C_3 plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 533-594.

Problemas

1. Papel da fosforilação oxidativa na gliconeogênese. É possível obter a síntese líquida de glicose a partir do piruvato se o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa estiverem totalmente inibidos?

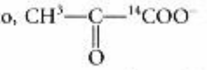
2. Via dos átomos na gliconeogênese. Em experimentos separados, um extrato de fígado, capaz de realizar todas as reações metabólicas normais, é incubado por um curto período com os seguintes precursores ^{14}C marcados:

(a) [^{14}C]Bicarbonato,



$HO—^{14}C(=O)O^-$

(b) [1-^{14}C]Piruvato,



$CH^3—C(=O)—^{14}COO^-$

Indique a via de cada precursor ao longo da gliconeogênese. Indique a localização do ^{14}C em todos os intermediários do processo e no produto final, a glicose.

3. Via do CO_2 na gliconeogênese. Na primeira etapa de desvio da gliconeogênese, a conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato, o piruvato é carboxilado pela piruvato carboxilase em oxaloacetato e, então, subseqüentemente, descarboxilado pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase, produzindo o fosfoenolpiruvato. A observação de que a adição do CO_2 é diretamente seguida pela perda de CO_2 sugere que o ^{14}C do $^{14}CO_2$ não seria incorporado no fosfoenolpiruvato, na glicose ou qualquer dos intermediários da gliconeogênese. Entretanto, descobriu-se que quando as fatias do fígado de rato sintetizam glicose na presença do $^{14}CO_2$, o ^{14}C aparece lentamente no fosfoenolpiruvato e eventualmente aparece em C-3 e C-4 da glicose. Como o ^{14}C marcado entra no fosfoenolpiruvato e nos carbonos 3 e 4 da glicose? (Dica: durante a gliconeogênese na presença de $^{14}CO_2$, vários dos intermediários de quatro carbonos do ciclo do ácido cítrico também se tornam marcados.)

4. Custo energético de um ciclo de glicólise e gliconeogênese. Qual é o custo (em equivalentes de ATP) da transformação de glicose em piruvato por meio da via glicolítica e do retorno à glicose por meio da gliconeogênese?

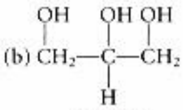
5. Regulação da glicólise e da gliconeogênese. Como tanto a glicólise como a gliconeogênese são irreversíveis, não há qualquer barreira para que ambas funcionem simultaneamente. Qual seria o resultado caso elas funcionassem simultaneamente e com a mesma velocidade? O que impede esse acontecimento nas células? Quais as circunstâncias que decidem qual via estará em operação em um dado momento?

6. Regulação da frutose-1,6-bifosfatase e da fosfofrutoquinase-1. Quais são os efeitos de concentrações crescentes de ATP e AMP nas atividades catalíticas da frutose-1,6-bifosfatase e da fosfofrutoquinase-1? Quais são as conseqüências desses efeitos do ATP e AMP no fluxo relativo dos metabólitos por meio da gliconeogênese e da glicólise?

7. Substratos glicogênicos. Um procedimento comum para a determinação da efetividade de compostos como precursores da glicose em mamíferos é colocar o animal em jejum até que os estoques de glicogênio do fígado sejam consumidos e então administrar o substrato em questão. Um substrato que provoca um aumento *líquido* no glicogênio hepático é chamado de glicogênico, pois ele deve primeiro ser convertido em glicose-6-fosfato. Mostre, por meio de reações enzimáticas conhecidas, quais das seguintes substâncias são glicogênicas:

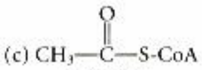
(a) $^-OOC_2—CH_2—CH_2—COO^-$

Succinato

(b) 

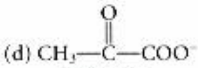
$$CH_2(OH)—CH(OH)—CH_2(OH)$$

Glicerol

(c) 

$$CH_3—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—S\text{-}CoA$$

Acetil-CoA

(d) 

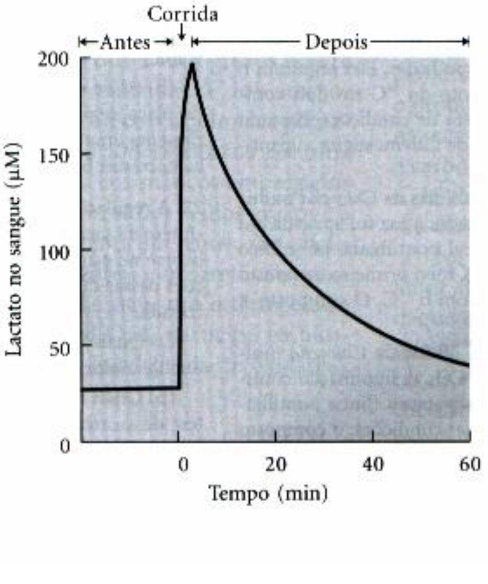
$$CH_3—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—COO^-$$

Piruvato

(e) $CH_3—CH_2—CH_2—COO^-$

Butirato

8. O lactato sangüíneo durante exercício vigoroso. As concentrações de lactato no plasma sangüíneo, antes, durante e depois de uma corrida de 400 metros, estão mostradas no gráfico a seguir.



(a) O que provoca a rápida elevação na concentração do lactato?

(b) O que provoca o declínio no nível do lactato depois do término da corrida? Por que o declínio ocorre mais lentamente do que a elevação?

(c) Por que a concentração do lactato não é igual a zero durante o estado de repouso?

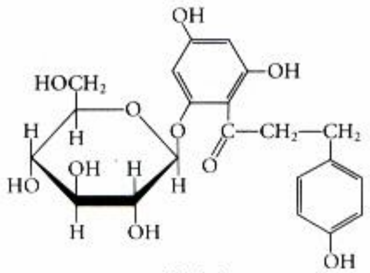
9. Relação entre frutose-1,6-bifosfatase e níveis de lactato no sangue. Um defeito congênito na enzima hepática frutose-1,6-bifosfatase resulta em concentrações de lactato no plasma sangüíneo anormalmente altas. Explique.

10. O etanol ingerido afeta a concentração de glicose no sangue. O consumo de álcool (etanol), especialmente após períodos de atividade muscular intensa ou após um longo período sem ingerir alimentos, resulta em baixa concentração de glicose no sangue, uma situação chamada de hipoglicemia. O primeiro passo do metabolismo do álcool no fígado é a oxidação dele até acetaldeído, reação catalisada pela álcool desidrogenase:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \longrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

Explique como esta reação inibe a transformação do lactato em piruvato e por que isso leva à hipoglicemia.

11. Efeito da florizina no metabolismo dos carboidratos. A florizina é um glicosídeo extraído da casca da pereira e bloqueia a reabsorção da glicose pelas células tubulares renais, isso faz com que a glicose presente no sangue seja quase totalmente excretada na urina. Ratos que ingerem florizina e succinato de sódio excretam perto de 0,5 mol de glicose (sintetizada por gliconeogênese) para cada mol de succinato ingerido. Como esse succinato é transformado em glicose? Explique a estequiometria.



Florizina

12. Excesso de captação de oxigênio durante a gliconeogênese. O lactato absorvido pelo fígado é convertido em glicose. Esse processo requer a entrada de 6 moles de ATP para cada mol de glicose produzida. A extensão desse processo, em fatias do fígado de rato, pode ser monitorada administrando [^{14}C]lactato e medindo-se a quantidade de [^{14}C]glicose produzida. Como a estequiometria entre o consumo de O_2 e a produção de ATP é conhecida (Capítulo 19), podemos predizer o consumo extra de O_2, acima da velocidade normal, quando uma dada quantidade de lactato for administrada. Entretanto, a quantidade de O_2 extra, necessária para a síntese da glicose a partir do lactato, quando medida, é sempre maior que aquela predita pelas reações estequiométricas conhecidas. Sugira a possível explicação para essa observação.

13. Em que ponto a síntese do glicogênio é regulada? Explique como as duas observações seguintes servem para identificar o ponto de regulação da síntese do glicogênio no músculo esquelético.

(a) A medida da atividade da glicogênio sintase no músculo em repouso, expressa em micromoles de UDP-glicose usados por grama de tecido e por minuto, é menor que a atividade da fosfoglicomutase ou da UDP-glicose pirofosforilase, cada uma medida em termos de micromoles de substrato transformado por grama por minuto.

(b) A estimulação da síntese do glicogênio leva a um pequeno decréscimo nas concentrações da glicose-6-fosfato e da glicose-1-fosfato, a um grande decréscimo na concentração da UDP-glicose, mas a um aumento substancial na concentração de UDP.

14. Qual é o custo do armazenamento da glicose na forma de glicogênio? Escreva a seqüência de etapas e a reação líquida final necessária para calcular o custo em número de moléculas de ATP da conversão citoplasmática de glicose-6-fosfato em glicogênio e, a seguir, novamente em glicose-6-fosfato. Qual fração, do número máximo de moléculas de ATP produzidas pelo catabolismo completo da glicose-6-fosfato a CO_2 e H_2O, esse custo representa?

15. Identificação de uma enzima defeituosa no metabolismo dos carboidratos. Uma amostra de tecido hepático foi obtida *post-mortem* do corpo de um paciente que se acreditava fosse geneticamente deficiente de uma das enzimas do metabolismo dos carboidratos. Uma amostra do homogeneizado do fígado tinha as seguintes características: (1) degradava glicogênio em glicose-6-fosfato; (2) era incapaz de sintetizar glicogênio a partir de qualquer açúcar ou de utilizar a galactose como fonte de energia; (3) sintetizava a glicose-6-fosfato a partir do lactato. Das três enzimas seguintes, qual estava deficiente? Apresente as razões para a sua escolha.

(a) Glicogênio fosforilase

(b) Frutose-1,6-bifosfatase

(c) UDP-glicose pirofosforilase

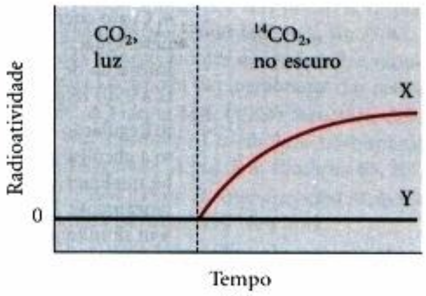
16. Cetose em ovelhas. Depois do nascimento de um filhote, a mama de uma ovelha usa quase 80% da glicose total sintetizada pelo animal. A glicose é empregada na produção do leite, principalmente na síntese da lactose e do glicerol-3-fosfato usado na formação dos triacilgliceróis do leite. Durante o inverno, quando a qualidade do alimento é pobre, a produção do leite decresce e as ovelhas algumas vezes desenvolvem cetose, isto é, elevação dos níveis plasmáticos de corpos cetônicos. Por que essas alterações ocorrem? Um tratamento-padrão para essa condição é a administração de grandes doses de propionato (substância que nos ruminantes é facilmente conversível em succinil-CoA). Como isso funciona?

17. Fases da fotossíntese. Quando uma suspensão de algas verdes é iluminada na ausência de dióxido de carbono e então incubada no escuro com $^{14}CO_2$, o $^{14}CO_2$ é convertido em [^{14}C]glicose, por um curto período. Qual é o significado dessa observação com respeito ao processo de assimilação do CO_2 e como ele está relacionado com as reações luminosas da fotossíntese? Por que cessa a conversão de $^{14}CO_2$ depois de um curto intervalo de tempo?

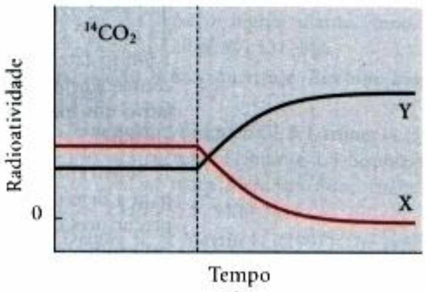
18. Identificação dos intermediários-chave na assimilação do CO_2. O pesquisador Calvin e seus colegas usaram a alga verde unicelular *Chlorella* para estudar as reações de assimilação do carbono da fotossíntese. Nos seus experimentos o $^{14}CO_2$ foi incubado com suspensões de algas iluminadas em diferentes condições. Eles seguiram o tempo do curso de aparecimento do ^{14}C em dois compostos, X e Y, em dois conjuntos de condições. Baseado no seu conhecimento do ciclo de Calvin, sugira a identidade de X e Y.

(a) Culturas iluminadas de células da *Chlorella* multiplicaram-se em CO_2 não-marcado; a luz foi apagada e o $^{14}CO_2$ adicionado (linha vertical pontilhada, no gráfico **a**, a seguir). Nessas condições, X foi o primeiro composto da alga a se tornar marcado com o ^{14}C. O composto Y não estava marcado.

(b) Culturas iluminadas de células da *Chlorella* multiplicaram-se na presença de $^{14}CO_2$. A iluminação continuou até que todo o $^{14}CO_2$ desapareceu (linha pontilhada no gráfico **b**, a seguir). Nessas condições, o composto X torna-se marcado rapidamente, mas perde a sua radioatividade com o passar do tempo. Por outro lado, o composto Y torna-se mais radioativo com o passar do tempo.



(a)



(b)

19. Via da assimilação do CO_2 no milho. Quando um pé de milho é iluminado na presença do gás $^{14}CO_2$, depois de 1 segundo cerca de 90% de toda a radioatividade incorporada nas folhas é encontrada nos átomos C-4 do malato, aspartato e oxaloacetato. Somente após 60 segundos o ^{14}C aparece no átomo C-1 do 3-fosfoglicerato. Explique.

20. Química da enzima málica: variações de um tema. A enzima málica, encontrada nas células envoltórias do feixe vascular das plantas C_4, realiza uma reação que tem uma contrapartida análoga no ciclo do ácido cítrico. Qual é a reação análoga? Explique.

21. A sacarose e a cárie dental. A infecção de maior prevalência mundial é a cárie dental humana; ela aparece pela destruição do esmalte dos dentes em decorrência da colonização por uma grande variedade de microrganismos acidificantes. Esses organismos sintetizam e vivem no interior de uma rede de dextranas insolúvel em água, chamada de placa dental bacteriana. Essa placa é composta por polímeros de glicose onde predominam as ligações ($\alpha1\rightarrow6$) e com a presença de ligações ($\alpha1\rightarrow3$) nos pontos de ramificação. A polimerização da dextrana requer a presença da sacarose da dieta e a reação é catalisada por uma enzima bacteriana, a dextrana-sacarose glicosil transferase.

(a) Escreva a reação global de polimerização da dextrana.

(b) Além de fornecer um substrato para a formação da placa dental, de que maneira a sacarose também representa uma abundante fonte de energia metabólica para as bactérias bucais?

22. A regulação da síntese de carboidratos nas plantas. A síntese da sacarose ocorre no citosol e a síntese do amido ocorre no estroma dos cloroplastos; não obstante, as reações dessas duas sínteses são equilibradas de maneira intricada.

(a) Quais fatores deslocam as reações em favor da síntese de amido?

(b) Quais fatores deslocam as reações em favor da síntese de sacarose?

(c) Dado que essas duas vias sintéticas ocorrem em compartimentos celulares separados, o que habilita esses processos a exercerem influência mútua?

CAPÍTULO 21

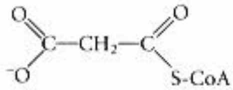
Biossíntese de Lipídios

Os lipídios desempenham uma grande variedade de funções celulares, inclusive algumas que apenas recentemente foram reconhecidas. Eles são a forma principal de armazenamento de energia na maioria dos organismos, bem como os principais constituintes das membranas celulares. Os lipídios especializados funcionam como pigmentos (retinal, caroteno), co-fatores enzimáticos (vitamina K), detergentes (sais biliares), transportadores (dolicóis), hormônios (derivados da vitamina D, hormônios sexuais), mensageiros intra e extracelulares (eicosanóides e derivados do fosfatidilinositol) e, ainda, funcionam como âncoras para as proteínas de membranas biológicas (ácidos graxos ligados covalentemente, grupos prenil e fosfatidilinositol). Assim, a capacidade de sintetizar uma grande variedade de lipídios é essencial para todos os organismos. Este capítulo descreve as vias biossintéticas de alguns dos principais lipídios presentes na maioria das células, ilustrando as estratégias empregadas na montagem dessas substâncias que, sendo insolúveis na água, são feitas a partir de precursores mais simples e solúveis em água, como o acetato. Como em outras vias biossintéticas, essas seqüências de reações são endergônicas e de caráter redutor. Elas empregam o ATP como fonte de energia metabólica e um transportador de elétrons reduzido (geralmente o NADPH) como fornecedor de equivalentes redutores.

Descreveremos em primeiro lugar a biossíntese dos ácidos graxos, os maiores componentes dos triacilgliceróis e dos fosfolipídios. A seguir, examinaremos a montagem dos ácidos graxos em triacilgliceróis e nos tipos mais simples de fosfolipídios de membrana. Finalmente, será explicada a síntese do colesterol, um componente importante de algumas membranas e o precursor dos produtos esteróides, como os ácidos biliares, os hormônios sexuais e os hormônios do córtex adrenal.

Biossíntese dos Ácidos Graxos e dos Eicosanóides

Quando se descobriu que a oxidação dos ácidos graxos ocorre pela remoção oxidativa e sucessiva de unidades de dois átomos de carbono (acetil-CoA) (veja Fig. 17-8), os bioquímicos pensaram que a biossíntese dos ácidos graxos poderia ocorrer por uma simples reversão de alguns dos passos enzimáticos empregados em sua oxidação. Entretanto, a biossíntese dos ácidos graxos e a sua oxidação ocorrem por vias totalmente diferentes, são catalisadas por conjuntos diferentes de enzimas e ocorrem em compartimentos distintos da célula. Ainda mais, um intermediário de três átomos de carbono, o **malonil-CoA**, participa na biossíntese dos ácidos graxos, mas não na sua degradação oxidativa.



Malonil-CoA

Estudaremos primeiro a via de síntese dos ácidos graxos, depois voltaremos nossa atenção, sucessivamente, para a regulação da via e para as biossínteses dos ácidos graxos de cadeia longa, dos ácidos graxos insaturados e dos seus derivados eicosanóides.

O malonil-CoA é sintetizado do acetil-CoA e do bicarbonato

A formação irreversível do malonil-CoA a partir do acetil-CoA é catalisada pela **acetil-CoA carboxilase**. A acetil-CoA carboxilase de bactérias contém três subunidades polipeptídicas separadas (Fig. 21-1); nas células animais, todas as três atividades fazem parte de um único polipeptídeo multifuncional. As células vegetais contêm as duas formas da acetil-CoA carboxilase. Em todos os casos, a acetil-CoA carboxilase contém uma molécula de biotina como grupo prostético ligado covalentemente por meio de uma ligação amida ao grupo ε-amino de um resíduo de lisina presente em uma das três subunidades da molécula enzimática. A reação de dois passos é muito parecida com as outras reações de carboxilação dependentes de biotina, como aquelas catalisadas pela piruvato carboxilase (veja Fig. 16-14) e propionil-CoA carboxilase (veja Fig. 17-11). O grupo carboxila, derivado do bicarbonato (HCO_3^-), é primeiro transferido para a biotina em uma reação dependente de ATP. O grupo biotinil funciona como um transportador temporário do CO_2, transferindo-o para o acetil-CoA no segundo passo e liberando o malonil-CoA.

Os ácidos graxos são sintetizados por uma seqüência repetitiva de reações

As longas cadeias carbônicas dos ácidos graxos são montadas em uma seqüência repetitiva de reações com quatro passos (Fig. 21-2). O grupo acila saturado produzido durante esse conjunto de reações se transforma no substrato de uma nova condensação com o grupo malonil ativado. Cada uma das passagens através do ciclo aumenta a cadeia do grupo acil graxo de dois átomos de carbono. Quando o comprimento da cadeia atinge 16 carbonos, o produto formado (o palmitato, 16:0; veja Tabela 11-1) abandona o ciclo. Os átomos de carbono constituindo os grupos metila e carboxila do grupo acetil tornam-se, respectivamente, C-16 e C-15 do palmitato (Fig. 21-3); os átomos de carbono restantes são derivados do acetil-CoA via malonil-CoA.

Na seqüência anabólica redutiva tanto o co-fator transportador de elétrons quanto os grupos ativadores são diferentes daqueles que atuam no processo catabólico oxidativo. Recorde que na β-oxidação, o NAD^+ e o FAD funcionam como receptores de elétrons e que o grupo ativador é o grupo tiol (—SH) da coenzima A (veja Fig. 17-8). Em contraste, o agente redutor na seqüência sintética é o NADPH e os grupos ativadores são dois grupos —SH diferentes ligados à enzima que serão descritos adiante.

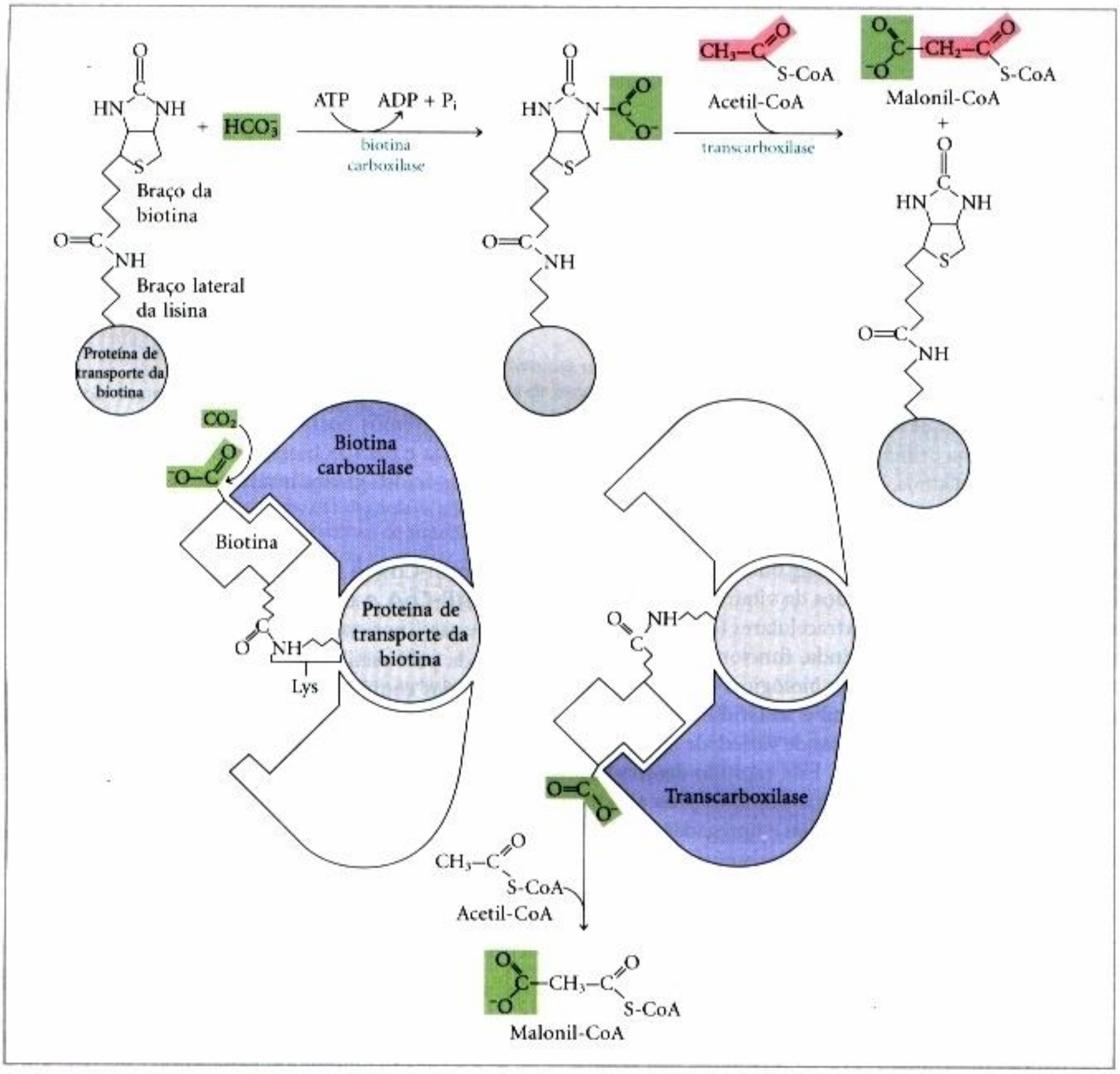

HN
NH
S
HCO₃⁻
Braço da
biotina
Braço lateral
da lisina
Proteína de
transporte da
biotina
ATP
ADP + Pᵢ
biotina
carboxilase
transcarboxilase
Acetil-CoA
Malonil-CoA
S-CoA
CO₂
Biotina
carboxilase
Biotina
Proteína de
transporte da
biotina
Lys
Transcarboxilase
Acetil-CoA
Malonil-CoA

Figura 21-1 – A reação da acetil-CoA carboxilase. A acetil-CoA carboxilase tem três regiões funcionais: a proteína transportadora de biotina (cinza); a biotina carboxilase, que ativa o CO_2 pela sua ligação a um átomo de nitrogênio no anel da biotina em uma reação dependente de ATP (veja Fig. 16-14); e a transcarboxilase, que transfere o CO_2 (em verde) ativado da biotina para o acetil-CoA, produzindo o malonil-CoA. O braço longo e flexível da biotina carrega o CO_2 ativado da região de biotina carboxilase para o sítio ativo de transcarboxilase, como mostrado no diagrama, logo abaixo das setas indicativas das reações. Em cada caso, a enzima ativa está sombreada em azul.

No processo sintético, todas as reações são catalisadas por um complexo multienzimático, a **ácido graxo sintase**. Embora os detalhes da estrutura enzimática sejam diferentes em procariotos, como a *Escherichia coli*, e em eucariotos, a seqüência de reações é idêntica em todos os organismos. Descreveremos primeiro o processo como ele existe na *Escherichia coli*, depois consideraremos as diferenças na estrutura enzimática de outros organismos.

O complexo da ácido graxo sintase tem sete sítios ativos diferentes

O núcleo da ácido graxo sintase da *E. coli* consiste de sete polipeptídeos e ao menos três outras proteínas agem em algum estágio do processo (Tabela 21-1). Essas proteínas agem em conjunto para catalisar a formação de ácidos graxos a partir de acetil-CoA e malonil-CoA. Por meio de todo o processo, os intermediários permanecem covalentemente ligados a um dos dois

Tabela 21-1 – Proteínas do complexo da ácido graxo sintase da *E. coli*

Proteína	Função
Proteína transportadora do grupo acila (ACP)	Transporta grupos acila em ligação tioéster
Acetil-CoA–ACP transacetilase (AT)	Transfere o grupo acila da CoA para um resíduo de cisteína em KS
β-Cetoacil-ACP sintase (KS)	Condensa o grupo acila e malonil (existem pelo menos três isozimas de KS)
Malonil-CoA–ACP transferase (MT)	Transfere o grupo malonil da CoA para a ACP
β-Cetoacil-ACP redutase (KR)	Reduz o grupo β-ceto em grupo β-hidroxi
β-Hidroxiacil-ACP desidratase (HD)	Remove H_2O do β-hidroxiacil-ACP, criando uma dupla ligação
Enoil-ACP redutase (ER)	Reduz a dupla ligação, formando o acil-ACP saturado

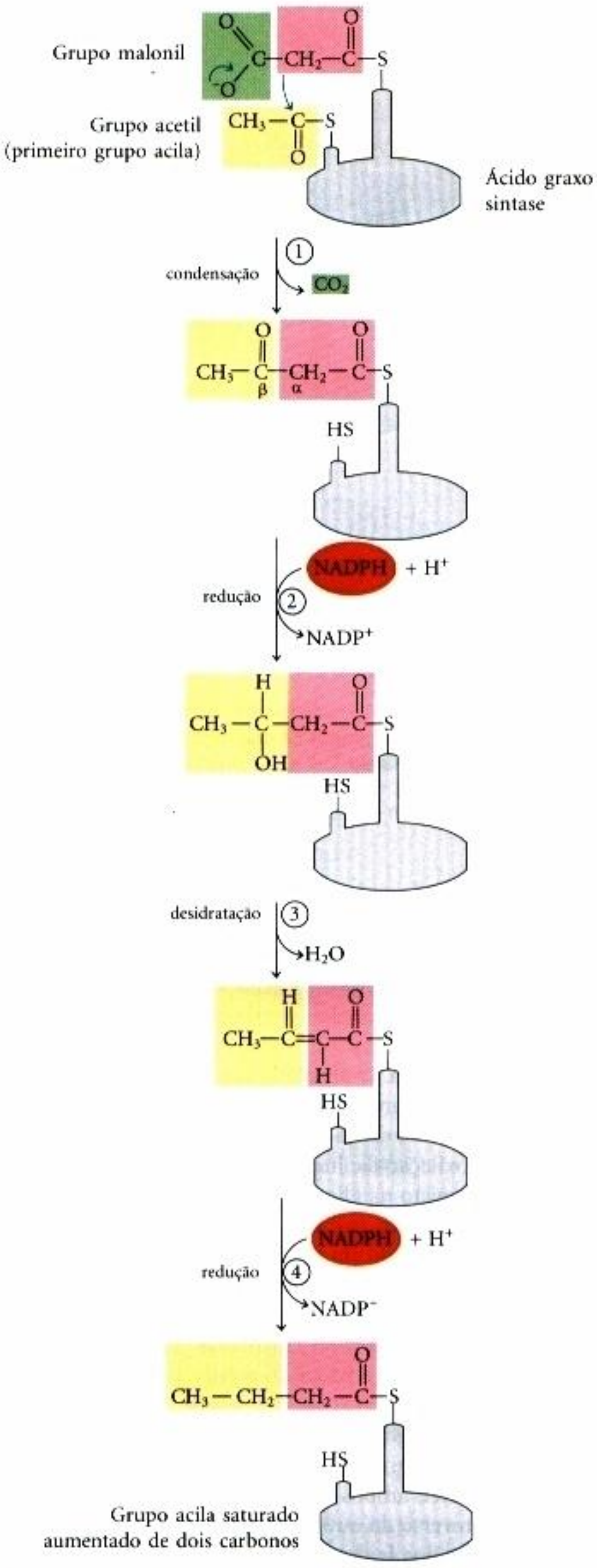


Figura 21-2 – A seqüência de quatro passos aumenta de dois átomos de carbono a cadeia do acil-graxo em crescimento. Cada grupo malonil e acetil (ou um acila maior) é ativado por um tioéster que se une à ácido graxo sintase, um complexo multienzimático descrito no texto. ① O primeiro passo é a condensação de um grupo acila ativado (um grupo acetil é o primeiro grupo acila) com dois átomos de carbono derivados do malonil-CoA, com a eliminação de CO_2 do grupo malonil; o resultado líquido final é o aumento de dois átomos de carbono na cadeia do grupo acila. O produto β-ceto dessa condensação é então reduzido em três passos subseqüentes muito idênticos às reações da β-oxidação, mas na seqüência inversa: ② o grupo β-ceto é reduzido a um álcool, ③ a eliminação de H_2O cria uma dupla ligação e ④ a dupla ligação é reduzida para formar o grupo acil-graxo saturado correspondente.

grupos tióis do complexo. Um ponto de ligação é o grupo —SH de um resíduo de cisteína existente em uma das sete proteínas (β-cetoacil-ACP sintase, descrita adiante); o outro é o grupo —SH da proteína transportadora de grupos acila, com a qual os intermediários acila da síntese dos ácidos graxos formam um tioéster.

A **proteína transportadora de grupos acila** (ACP) da *E. coli* (Tabela 21-1) é uma proteína pequena (M_r 8.860) contendo o grupo prostético **4'-fosfopantoteína** (Fig. 21-4; comparável ao ácido pantotênico e à β-mercaptilamina da coenzima A, Fig. 10-41). O tioéster que liga a ACP a um grupo acila tem uma alta energia livre de hidrólise e a energia liberada quando essa ligação é rompida ajuda a fazer, termodinamicamente favorável, a primeira reação (condensação) na síntese dos ácidos graxos. Acredita-se que o grupo prostético 4'-fosfopantoteína da ACP sirva como um braço flexível, segurando a cadeia de ácido graxo em crescimento na superfície do complexo da ácido graxo sintase e transportando os intermediários das reações de um sítio ativo para o seguinte.

A ácido graxo sintase recebe os grupos acetil e malonil

Antes que possam começar as reações de condensação que constroem a cadeia do ácido graxo, os dois grupos tióis do complexo enzimático precisam ser carregados com os grupos acila corretos (topo da Fig. 21-5). Primeiro, o grupo acetil do acetil-CoA é transferido para o grupo Cys —SH da β-cetoacil-ACP sintase. Essa reação é catalisada pela **acetil-CoA–ACP transacetilase.** A segunda reação transfere o grupo malonil do malonil-CoA para o grupo —SH da ACP, ela é catalisada pela **malonil-CoA–ACP transferase**, também parte do complexo. No complexo da sintase carregado, os grupos acetil e malonil estão muito próximos um do outro e são ativados para o processo de alongamento da cadeia, o qual consiste dos quatro passos expostos na Figura 21-5 e que serão agora explicados com mais detalhes.

Passo ① Condensação. O primeiro passo na formação da cadeia do ácido graxo é a condensação dos grupos ativados acetil e malonil para formar um grupo **acetoacetil-ACP**, um grupo acetoacetil ligado à ACP pelo grupo —SH da fosfopantoteína; simultaneamente, é produzida uma molécula de CO_2 (Fig. 21-5). Nessa reação, catalisada pela **β-cetoacil-ACP sintase**, o grupo acetil é transferido do grupo Cys —SH dessa enzima para o grupo malonil no —SH da ACP, tornando-se a unidade de dois carbonos metilterminal do novo grupo acetoacetil.

O átomo de carbono presente no CO_2 que se forma nessa reação é o mesmo átomo de carbono que foi originalmente introduzido no malonil-CoA a partir do HCO_3^- pela reação da acetil-CoA carboxilase (Fig. 21-1). Assim, a ligação covalente do CO_2 durante a biossíntese dos ácidos graxos é apenas transiente sendo removida logo após cada unidade de dois carbonos ser inserida na cadeia.

Por que as células se dão ao trabalho de adicionar CO_2 para sintetizar um grupo malonil, transformando um grupo acetil, se logo após, durante a formação do acetoacetato, perdem o mesmo CO_2? Lembre-se de que, na β-oxidação dos ácidos graxos (veja Fig. 17-8), o rompimento da ligação entre dois grupos acila (a clivagem de uma unidade de acetil da cadeia acila) é altamente exergônica. Portanto, a simples condensação de dois grupos acila (de duas moléculas de acetil-CoA, por exemplo) é endergônica. O envolvimento de grupos malonil ativados, em lugar grupos acetil, tornam a reação de condensação termodinamicamente favorável. O carbono metileno (C-2) do

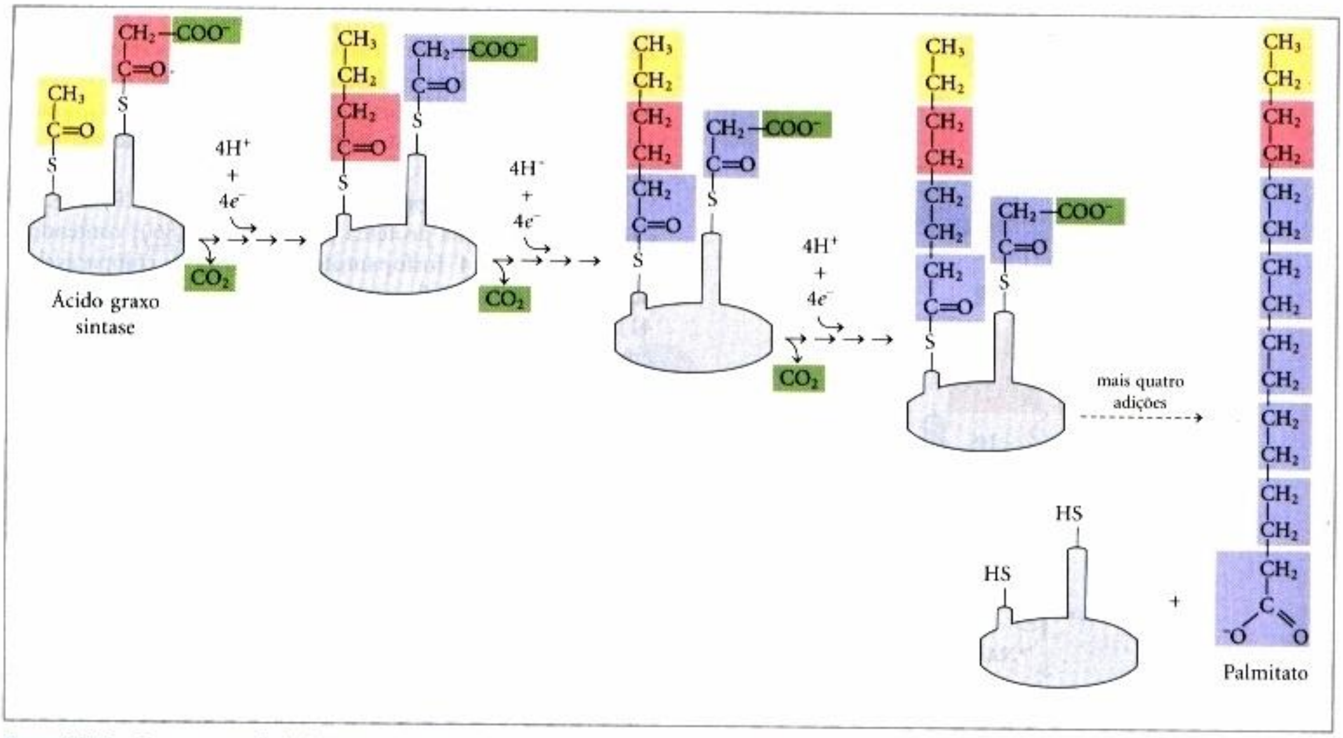


Figura 21-3 – O processo global da síntese do palmitato. A cadeia acil-graxo cresce pela adição de grupos de dois átomos de carbono doados pelo malonato ativado e com perda de CO_2 a cada ciclo. O grupo acetil inicial está sombreado em amarelo; C-1 e C-2 do malonato estão sombreados em vermelho e o CO_2 liberado está sombreado em verde. Após cada adição de dois carbonos, reações de redução convertem a cadeia em crescimento em um ácido graxo saturado com quatro átomos de carbono, depois com seis, depois com oito e assim sucessivamente. O produto final é o palmitato (16:0).

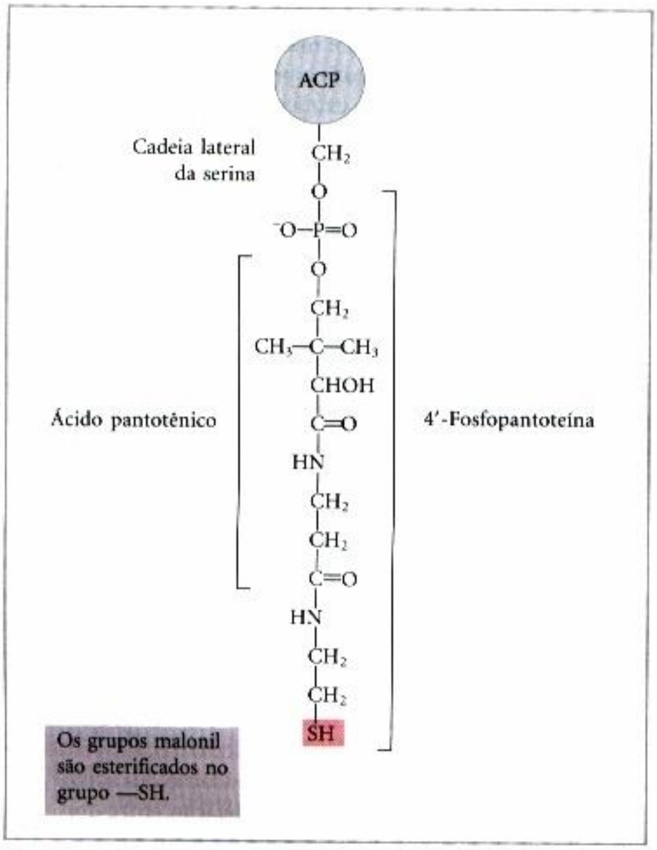


Figura 21-4 – Proteína transportadora de grupos acila (ACP). O grupo prostético é a 4'-fosfopantoteína, que está ligada covalentemente ao grupo hidroxila de um resíduo de serina na ACP. A fosfopantoteína contém pantotenato, uma vitamina do grupo B, também encontrada na molécula da coenzima A. O seu grupo sulfidrila —SH é o sítio de entrada dos grupos malonil durante a síntese dos ácidos graxos.

grupo malonil, situado entre os carbonos carbonila e carboxila, é um nucleofílico especialmente bom. No passo de condensação (passo ① na Fig. 21-5), a descarboxilação do grupo malonil facilita o ataque nucleofílico desse carbono metileno ao tioéster que liga o grupo acetil ao β-cetoacil-ACP sintase, deslocando o grupo —SH da enzima. O acoplamento da condensação à descarboxilação do grupo malonil torna o processo global altamente exergônico. Lembre-se de que uma seqüência similar de carboxilação-descarboxilação facilita a formação do fosfoenolpiruvato a partir de piruvato na gliconeogênese (veja Fig. 20-3).

Empregando grupos malonil ativados na síntese de ácidos graxos e o acetato ativado em sua degradação, a célula consegue fazer ambos os processos favoráveis, embora um seja efetivamente o inverso do outro. A energia extra necessária para fazer a síntese do ácido graxo favorável é fornecida pelo ATP usado para sintetizar o malonil-CoA a partir do acetil-CoA e do bicarbonato (Fig. 21-1).

Pelo emprego de grupos ativados malonil na síntese de ácidos graxos e acetato ativado na sua degradação, a célula consegue tornar favoráveis ambos os processos, não obstante um seja efetivamente o reverso do outro. A energia extra necessária para conduzir a síntese dos ácidos graxos de maneira favorável é fornecida pelo ATP empregado na síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e HCO_3^- (Fig. 21-1).

Passo ② Redução do grupo carbonila. O acetoacetil-ACP formado no passo de condensação (passo ① na Fig. 21-5) sofre, a seguir, redução do grupo carbonila em C-3 para formar D-β-hidroxibutiril-ACP (passo ②). Essa reação é catalisada pela **β-cetoacil-ACP redutase** e o doador de elétrons é o NADPH. Note que o grupo D-β-hidroxibutiril não tem a mesma forma estereoisomérica que o intermediário L-β-hidroxiacil na oxidação dos ácidos graxos (veja Fig. 17-8).

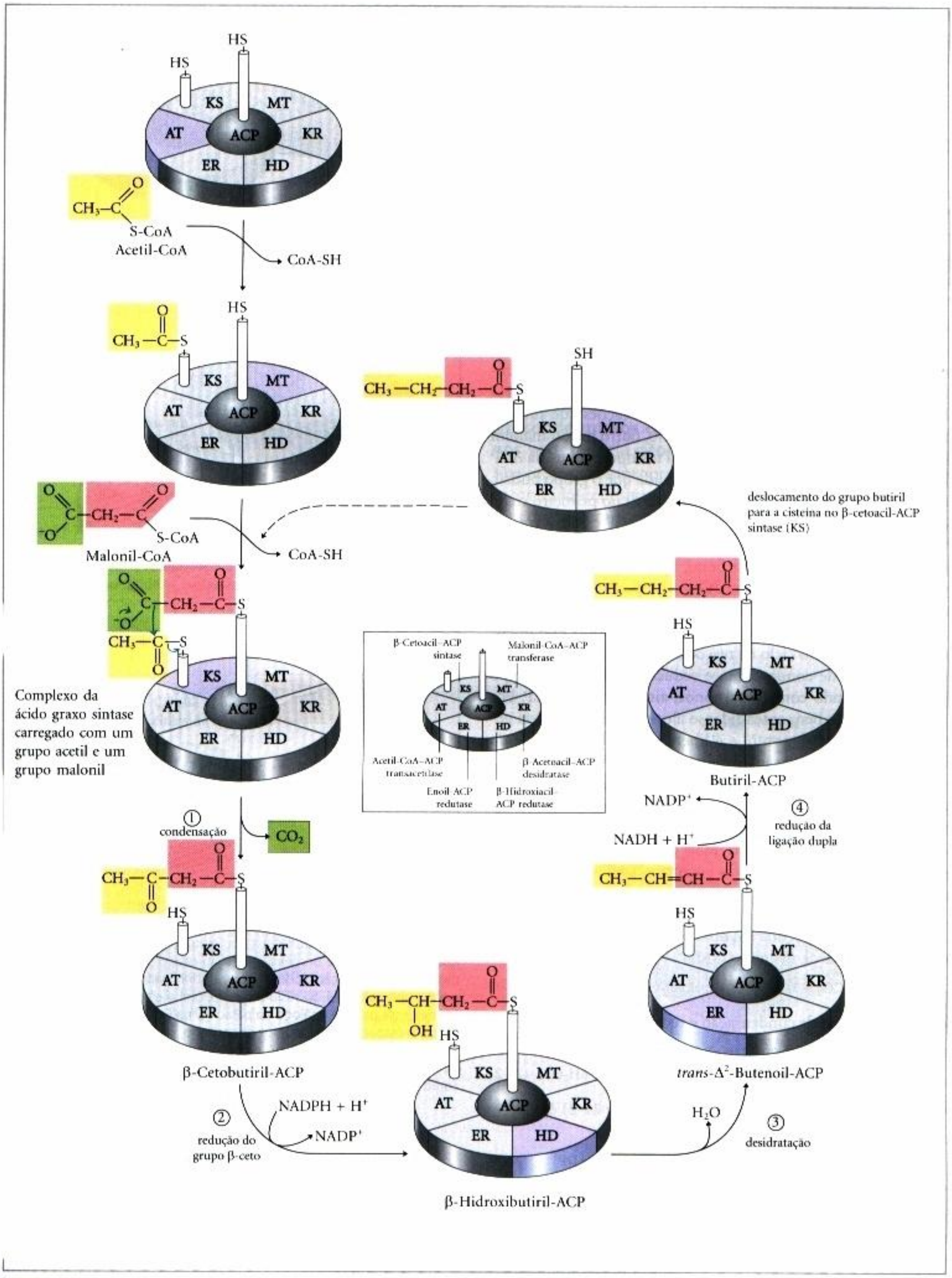

HS
KS
MT
AT
ACP
KR
ER
HD
CH₃—C(=O)—S-CoA
Acetil-CoA
CoA-SH
CH₃—C(=O)—S
SH
CH₃—CH₂—CH₂—C(=O)—S
deslocamento do grupo butiril para a cisteína no β-cetoacil-ACP sintase (KS)
⁻O—C(=O)—CH₂—C(=O)—S-CoA
Malonil-CoA
CoA-SH
Complexo da ácido graxo sintase carregado com um grupo acetil e um grupo malonil
β-Cetoacil–ACP sintase
Malonil-CoA–ACP transferase
Acetil-CoA–ACP transacetilase
β-Acetoacil–ACP desidratase
Enoil-ACP redutase
β-Hidroxiacil-ACP redutase
CH₃—CH₂—CH₂—C(=O)—S
Butiril-ACP
NADP⁺
NADH + H⁺
④ redução da ligação dupla
① condensação
CO₂
CH₃—C(=O)—CH₂—C(=O)—S
β-Cetobutiril-ACP
CH₃—CH=CH—C(=O)—S
trans-Δ²-Butenoil-ACP
CH₃—CH(OH)—CH₂—C(=O)—S
② redução do grupo β-ceto
NADPH + H⁺
NADP⁺
H₂O
③ desidratação
β-Hidroxibutiril-ACP

Figura 21-5 – A seqüência dos eventos durante a síntese de um ácido graxo. O complexo de ácido graxo sintase está mostrado esquematicamente. Cada segmento do disco representa uma das seis atividades enzimáticas do complexo. No centro está a proteína transportadora de acila (ACP), com o seu braço de fosfopantoteína terminando em outro grupo —SH. A enzima mostrada em azul é aquela que agirá no próximo passo. Como na Figura 21-3, o grupo acetil inicial é sombreado de amarelo; C-1 e C-2 do malonato estão sombreados em vermelho; e o carbono liberado como CO_2 está sombreado em verde.

Passo ③ Desidratação. No primeiro passo, os elementos da água são removidos de C-2 e C-3 do D-β-hidroxibutiril-ACP para liberar uma dupla ligação no produto, ***trans*-Δ^2-butenoil-ACP**. A enzima que catalisa essa desidratação é a **β-hidroxiacil-ACP desidratase**.

Passo ④ Redução da dupla ligação. Finalmente a dupla ligação do *trans*-Δ^2-butanoil-ACP é reduzido (saturado) para formar **butiril-ACP** pela ação da **enoil-ACP redutase**, de novo, o NADPH é o doador de elétrons.

As reações da ácido graxo sintase são repetidas para formar o palmitato

A produção de um acil-graxo-ACP saturado de quatro átomos de carbono completa um passo através do complexo da ácido graxo sintase. O grupo butiril é agora transferido da fosfopantoteína —SH da ACP para o resíduo Cys —SH da β-cetoacil-ACP sintase, a qual, inicialmente, possui o grupo acetil (Fig. 21-5). Para iniciar o próximo ciclo das quatro reações que aumentará a cadeia por dois átomos de carbono, outro grupo malonil é ligado no grupo —SH desocupado da fosfopantoteína da ACP (Fig. 21-6). A condensação ocorre à medida que o grupo butiril, agindo exatamente como agiu o grupo acetil no primeiro ciclo, é unido a dois carbonos do grupo malonil-ACP e com a concomitante perda de CO_2. O produto dessa condensação é um grupo acila de seis átomos de carbono, ligado covalentemente ao grupo —SH da fosfopantoteína. O seu grupo β-ceto é reduzido nos três passos subseqüentes do ciclo da sintase para liberar a acila com cadeia saturada de seis átomos de carbono, exatamente como no primeiro ciclo de reações.

Sete ciclos de condensação e redução produzem o grupo palmitoil saturado com 16 carbonos, ainda ligado à ACP. Por razões ainda não bem entendidas, o alongamento da cadeia geralmente pára nesse ponto, e é liberado o palmitato livre da molécula de ACP pela ação de uma atividade hidrolítica existente no complexo da sintase. Também são formadas pequenas quantidades de ácidos graxos mais longos como o estearato (18:0). Em certos vegetais (coqueiros e palmeiras, por exemplo), a terminação da cadeia ocorre mais cedo; até 90% dos ácidos graxos dos óleos dessas plantas possuem cadeias com comprimentos de 8 e 14 carbonos.

A reação global para a síntese do palmitato a partir de acetil-CoA pode ser repartida em duas partes. Primeiro a formação de sete moléculas de malonil-CoA:

$$7\ \text{Acetil-CoA} + 7CO_2 + 7\text{ATP} \longrightarrow 7\ \text{malonil-CoA} + 7\text{ADP} + 7P_i \quad (21\text{-}1)$$

e então sete ciclos de condensação e redução:

$$\text{Acetil-CoA} + 7\ \text{malonil-CoA} + 14\text{NADPH} + 14H^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 7CO_2 + 8\text{CoA} + 14\text{NADP}^+ + 6H_2O \quad (21\text{-}2)$$

O processo global (a soma das Equações 21-1 e 21-2) é:

$$8\ \text{Acetil-CoA} + 7\text{ATP} + 14\text{NADPH} + 14H^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 8\text{CoA} + 6H_2O + 7\text{ADP} + 7P_i + 14\text{NADP}^+ \quad (21\text{-}3)$$

A biossíntese de ácidos graxos como o palmitato requer assim acetil-CoA e o fornecimento de energia química em duas formas: o grupo de transferência potencial do ATP e a força redutora do NADPH. O ATP é necessário para ligar o CO_2 ao acetil-CoA durante a síntese do malonil-CoA; o NADPH é necessário para reduzir as duplas ligações. Voltaremos logo a essas fontes de acetil-CoA e NADPH, mas antes vamos estudar a estrutura do notável complexo enzimático que catalisa a síntese dos ácidos graxos.

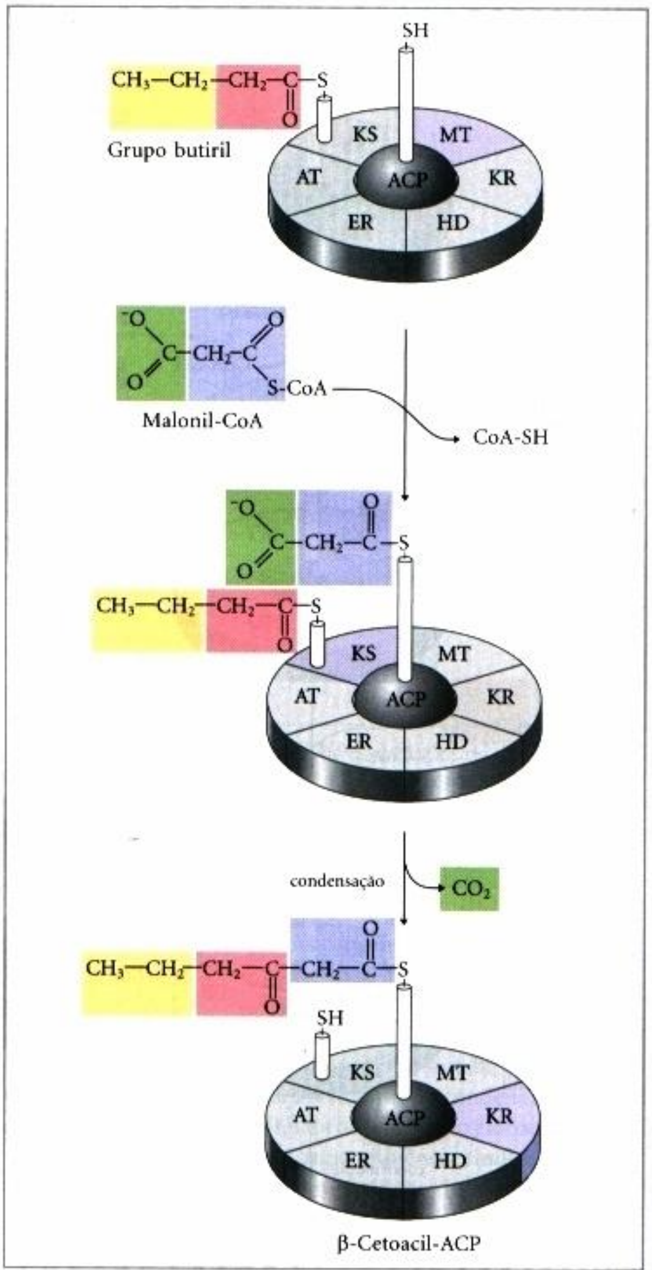


Figura 21-6 – Início da segunda rodada do ciclo da síntese dos ácidos graxos. O grupo butiril está no grupo Cys —SH. O grupo malonil que está entrando é primeiro ligado ao grupo —SH da pantoteína. No passo de condensação, todo o grupo butiril ligado a Cys —SH é trocado pelo grupo carboxila do resíduo de malonil e este é perdido como CO_2 (verde). Esse passo é análogo ao passo ① na Figura 21-5. O produto, um grupo β-cetoacil de seis átomos de carbono, contém agora quatro carbonos derivados do malonil-CoA e dois derivados do acetil-CoA que iniciaram a reação. O grupo β-cetoacil agora passa pelos passos ② até ④, como na Figura 21-5.

A ácido graxo sintase de alguns organismos é constituída de proteínas multifuncionais

Os sete sítios ativos para a síntese de ácidos graxos (seis enzimas e a ACP) estão em sete polipeptídeos separados da ácido graxo sintase da *E. coli* e de alguns vegetais (Fig. 21-7). Nesses complexos, cada enzima é posicionada na seqüência de reações com o seu sítio ativo próximo daquele que a precede e do sítio ativo da enzima seguinte. O braço flexível de pantoteína da ACP pode chegar a todos os sítios ativos, e ele transporta a cadeia do acil-graxo em crescimento de um sítio para o próximo; os intermediá-

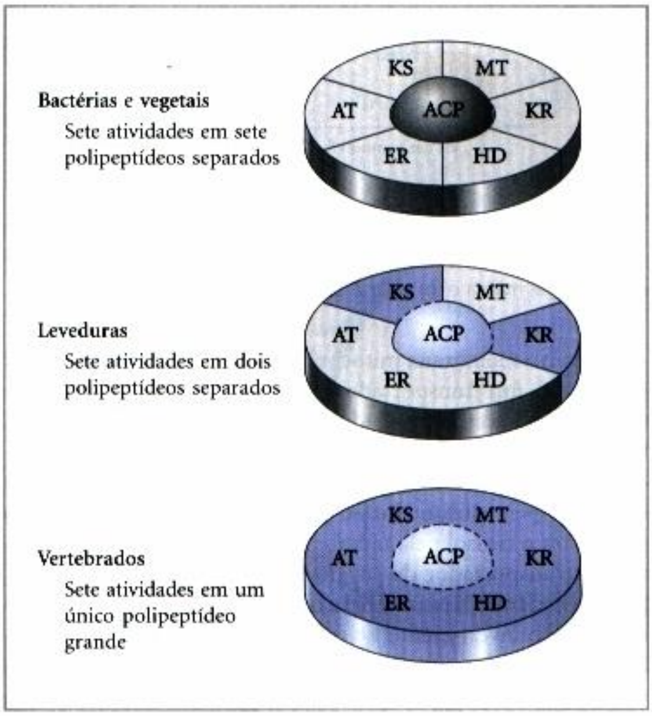

Bactérias e vegetais
Sete atividades em sete polipeptídeos separados
KS
MT
AT
ACP
KR
ER
HD
Leveduras
Sete atividades em dois polipeptídeos separados
KS
MT
AT
ACP
KR
ER
HD
Vertebrados
Sete atividades em um único polipeptídeo grande
KS
MT
AT
ACP
KR
ER
HD

Figura 21-7 – Estrutura das sintases dos ácidos graxos. A ácido graxo sintase de bactérias e vegetais é um complexo de sete polipeptídeos diferentes. Na levedura, todas as sete atividades localizam-se em apenas dois polipeptídeos, enquanto nos vertebrados em um único polipeptídeo grande.

rios não são liberados do complexo enzimático até que seja obtido o produto final. Como nos casos que encontramos nos capítulos anteriores, essa canalização dos intermediários de um sítio ativo para o próximo aumenta a eficiência do processo global.

As ácido graxo sintases da levedura e dos vertebrados são também complexos multienzimáticos, porém a sua integração é ainda mais completa que na *E. coli* e nos vegetais. Na levedura, os sete sítios ativos distintos localizam-se em apenas dois polipeptídeos multifuncionais muito grandes, e nos vertebrados, um único polipeptídeo grande (M_r 240.000) contém todas as sete atividades enzimáticas, bem como a atividade hidrolítica que libera o ácido graxo da porção ACP do complexo enzimático. A forma ativa dessa proteína multifuncional é um dímero (M_r 480.000) no qual as duas subunidades idênticas estão dispostas "cabeça com cauda" formando dois sítios ativos nas interfaces. O alongamento da cadeia acila em crescimento em uma subunidade é catalisado por sítios situados na outra subunidade.

A síntese dos ácidos graxos ocorre no citosol de muitos organismos, mas nos vegetais ela ocorre nos cloroplastos

Nos eucariotos superiores, o complexo da ácido graxo sintase é encontrado exclusivamente no citosol (Fig. 21-8), como também ocorre com as enzimas que fazem a biossíntese dos nucleotídeos, dos aminoácidos e da glicose. Essa localização segrega os processos sintéticos das reações degradativas, muitas das quais ocorrem na matriz mitocondrial. Existe uma segregação correspondente dos co-fatores transportadores de elétrons para o ana-

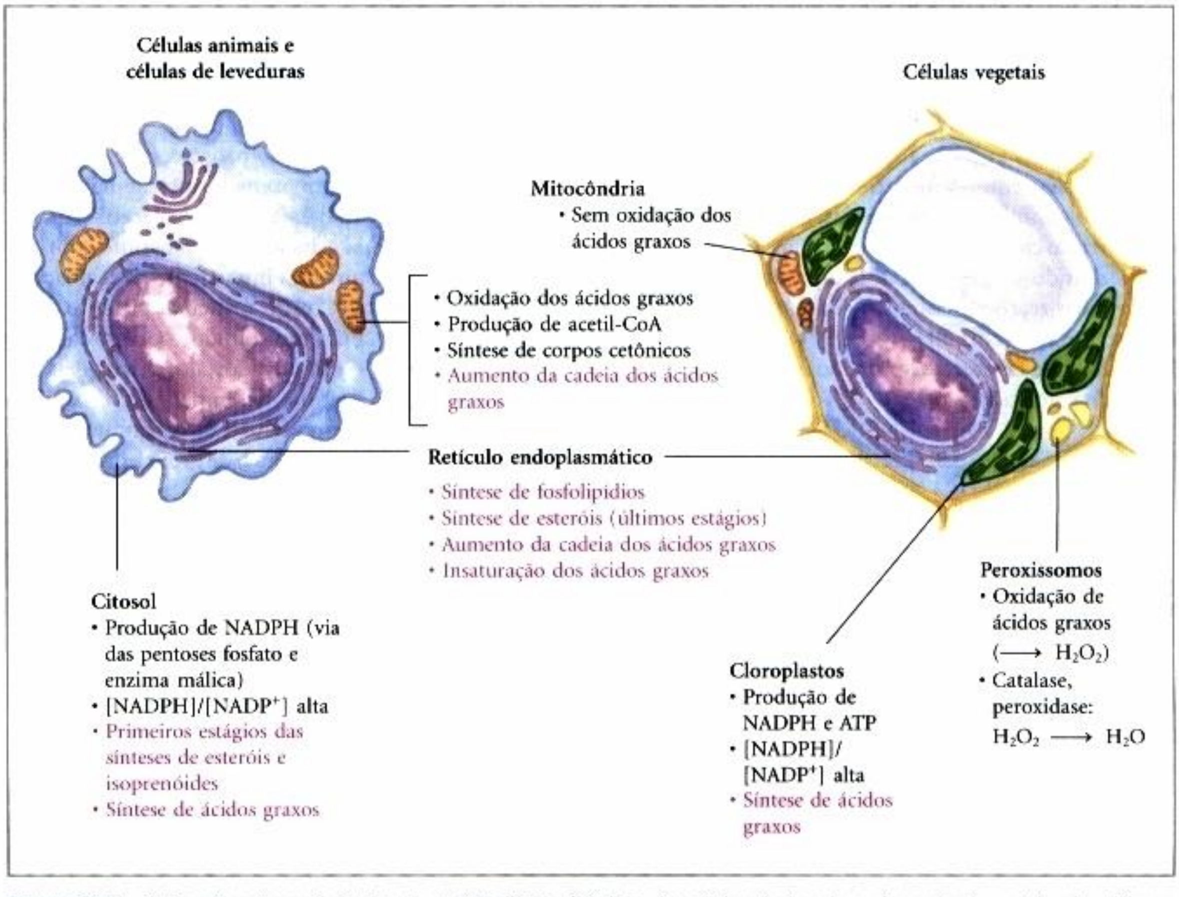

Células animais e células de leveduras
Células vegetais
Mitocôndria
• Sem oxidação dos ácidos graxos
• Oxidação dos ácidos graxos
• Produção de acetil-CoA
• Síntese de corpos cetônicos
• Aumento da cadeia dos ácidos graxos
Retículo endoplasmático
• Síntese de fosfolipídios
• Síntese de esteróis (últimos estágios)
• Aumento da cadeia dos ácidos graxos
• Insaturação dos ácidos graxos
Citosol
• Produção de NADPH (via das pentoses fosfato e enzima málica)
• [NADPH]/[NADP$^+$] alta
• Primeiros estágios das sínteses de esteróis e isoprenóides
• Síntese de ácidos graxos
Cloroplastos
• Produção de NADPH e ATP
• [NADPH]/[NADP$^+$] alta
• Síntese de ácidos graxos
Peroxissomos
• Oxidação de ácidos graxos ($\longrightarrow H_2O_2$)
• Catalase, peroxidase: $H_2O_2 \longrightarrow H_2O$

Figura 21-8 – A localização subcelular do metabolismo lipídico. As células do levedo e dos animais vertebrados diferem daquela encontrada nos vegetais superiores. A síntese dos ácidos graxos ocorre no compartimento no qual o NADPH é disponível para as reduções de síntese (isto é, onde a razão [NADPH]/[NADP$^+$] é alta). Os processos mostrados em vermelho são descritos neste capítulo.

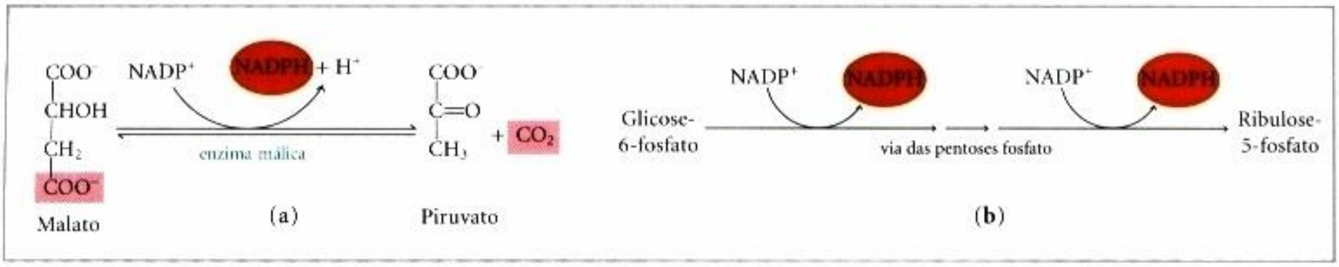


Figura 21-9 – Produção do NADPH. Duas vias para o NADPH catalisadas por (**a**) enzima málica e (**b**) via das pentoses fosfato.

bolismo (geralmente um processo redutivo) e aqueles para o catabolismo (geralmente um processo oxidativo). Em geral, o NADPH é o transportador de elétrons para as reações anabólicas e o NAD^+ funciona nas reações catabólicas. Nos hepatócitos, a relação $[NADPH]/[NADP^+]$ é muito alta (perto de 75) no citosol, fornecendo um ambiente fortemente redutor para a síntese redutiva dos ácidos graxos e outras biomoléculas. Como a relação citosólica $[NADH]/[NAD^+]$ é muito menor (apenas perto de 8×10^{-4}), o catabolismo oxidativo da glicose dependente de NAD^+ pode ocorrer no mesmo compartimento e ao mesmo tempo em que ocorre a síntese dos ácidos graxos. A relação $[NADH]/[NAD^+]$ dentro da mitocôndria é muito mais alta que no citosol devido ao fluxo de elétrons para o NAD^+ proveniente da oxidação dos ácidos graxos, aminoácidos, piruvato e acetil-CoA. Essa relação $[NADH]/[NAD^+]$ alta favorece a redução do oxigênio por meio da cadeia respiratória.

Nos hepatócitos e nos adipócitos, o NADPH citosólico é gerado em grande proporção pela via das pentoses fosfato (veja Fig. 15-20) e pela **enzima málica** (Fig. 21-9a). A enzima málica ligada ao NADP na via de fixação do carbono das plantas C_4 (veja Fig. 20-40) não está relacionada com as enzimas acima citadas. O piruvato produzido na reação mostrada na Figura 21-9a entra novamente na mitocôndria. Nos hepatócitos e na glândula mamária de animais em lactação, o NADPH necessário para a biossíntese dos ácidos graxos é fornecido principalmente pelas reações da via das pentoses fosfato (Fig. 21-9b).

Nas células fotossintéticas dos vegetais, a síntese dos ácidos graxos não ocorre no citosol mas no estroma do cloroplasto (Fig. 21-8). Isso faz sentido já que o NADPH é produzido no cloroplasto por meio das reações luminosas da fotossíntese (Fig. 21-10). Outra vez, a razão $[NADPH]/[NADP^+]$ elevada fornece o ambiente redutor que favorece os processos anabólicos redutivos como a síntese de ácidos graxos.

$$H_2O + NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} \tfrac{1}{2}O_2 + NADPH + H^+$$

Figura 21-10 – Produção de NADPH por fotossíntese.

O acetato é transportado para fora da mitocôndria na forma de citrato

Nos eucariotos que não realizam a fotossíntese quase todo o acetil-CoA empregado na síntese de ácidos graxos é oriundo da oxidação do piruvato nas mitocôndrias e do catabolismo dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos. O acetil-CoA que se origina da oxidação dos ácidos graxos não representa uma fonte significativa desses grupos para a síntese dos ácidos graxos, porque as duas vias são reguladas de forma recíproca, como descrito mais adiante.

Como a membrana mitocondrial interna é impermeável ao acetil-CoA, um transportador indireto transfere os equivalentes do grupo acetil através da membrana interna (Fig. 21-11). O acetil-CoA intramitocondrial reage primeiro com o oxaloacetato para formar citrato, na reação do ciclo do ácido cítrico catalisada pela **citrato sintase** (veja Fig. 16-7). O citrato então passa para o citosol pela membrana mitocondrial interna através do **transportador de citrato.** No citosol, a clivagem do citrato pela **citrato liase** regenera o acetil-CoA; essa reação é conduzida pelo investimento de energia oriunda do ATP. O oxaloacetato não pode voltar à matriz mitocondrial diretamente; não existe um transportador para ele. Em vez disso, o oxaloacetato é reduzido pela malato desidrogenase citosólica em malato, este volta à matriz mitocondrial, pela ação do transportador de malato–α-cetoglutarato que o troca por citrato e é reoxidado em oxaloacetato para completar o transporte. Alternativamente, o malato produzido no citosol é empregado para gerar NADPH citosólico por meio da atividade da enzima málica (Fig. 21-9a).

A biossíntese de ácidos graxos é regulada rigorosamente

Quando uma célula ou organismo tem em disponibilidade combustível metabólico mais que suficiente para suprir suas necessidades energéticas de momento, o excesso é em geral convertido em ácidos graxos e armazenado como lipídios, tais como os triacilgliceróis. A reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase é o passo limitante da velocidade na biossíntese dos ácidos graxos e essa enzima é um sítio importante de regulação. Nos vertebrados, o palmitoil-CoA, o principal produto da síntese de ácidos graxos, age como um inibidor por retroalimentação da enzima, e o citrato é um ativador alostérico (Fig. 21-12a) aumentando a $V_{máx}$. O citrato desempenha um papel central na passagem do metabolismo celular de consumidor de combustível metabólico (oxidação) para o de armazenador de ácidos graxos. Quando há um aumento nas concentrações mitocondriais de acetil-CoA e de ATP, o citrato é transportado para fora da mitocôndria e transforma-se tanto no precursor do acetil-CoA citosólico como em um sinal alostérico para a ativação da acetil-CoA carboxilase. Ao mesmo tempo, o citrato inibe a atividade da fosfofrutoquinase-1 (Fig. 15-18) reduzindo o fluxo de carbonos por meio da glicólise.

A acetil-CoA carboxilase é também regulada por modificação covalente. A fosforilação, acionada pelos hormônios glucagon e epinefrina, provoca sua inativação e, dessa forma, desacelera a síntese de ácidos graxos. Na sua forma ativa (desfosforilada), a acetil-CoA carboxilase se polimeriza em longos filamentos (Fig. 21-12b); a fosforilação é acompanhada por dissociação em subunidades monoméricas e perda da atividade.

A acetil-CoA carboxilase de vegetais e bactérias não é regulada por citrato ou por um ciclo de fosforilação-desfosforilação. A enzima vegetal é ativada por um aumento do pH estromal e

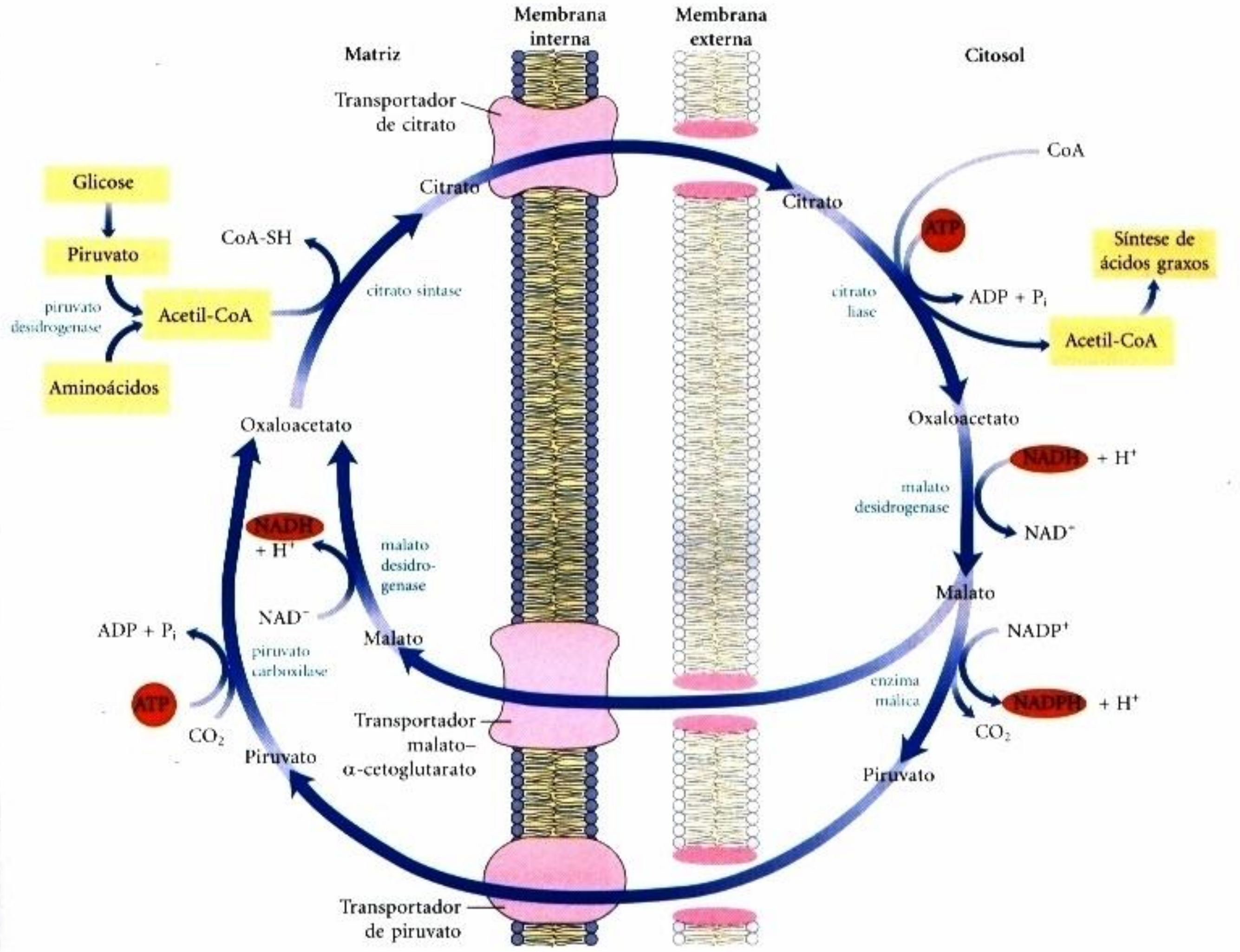

Membrana interna
Membrana externa
Matriz
Citosol
Transportador de citrato
Glicose
Piruvato
piruvato desidrogenase
Acetil-CoA
Aminoácidos
CoA-SH
Citrato
citrato sintase
Oxaloacetato
NADH
+ H⁺
NAD⁺
malato desidrogenase
Malato
ADP + Pᵢ
piruvato carboxilase
ATP
CO₂
Piruvato
Transportador malato–α-cetoglutarato
Transportador de piruvato
CoA
Citrato
ATP
citrato liase
ADP + Pᵢ
Síntese de ácidos graxos
Acetil-CoA
Oxaloacetato
NADH
+ H⁺
malato desidrogenase
NAD⁺
Malato
NADP⁺
enzima málica
NADPH
+ H⁺
CO₂
Piruvato

Figura 21-11 – O mecanismo de transporte dos grupos acetil da mitocôndria para o citosol. A membrana mitocondrial externa é livremente permeável a todos esses compostos. O piruvato, quer derivado do catabolismo dos aminoácidos na matriz mitocondrial, quer da glicose por glicólise no citosol, é convertido em acetil-CoA na mesma matriz. Os grupos acetil saem da mitocôndria como citrato; no citosol eles são liberados para a síntese dos ácidos graxos na forma de acetil-CoA. O oxaloacetato é transformado em malato que retorna à matriz mitocondrial onde é reconvertido em oxaloacetato. Um destino alternativo para o malato citosólico é sua oxidação pela enzima málica com concomitante produção do NADPH citosólico; o piruvato produzido volta à matriz mitocondrial.

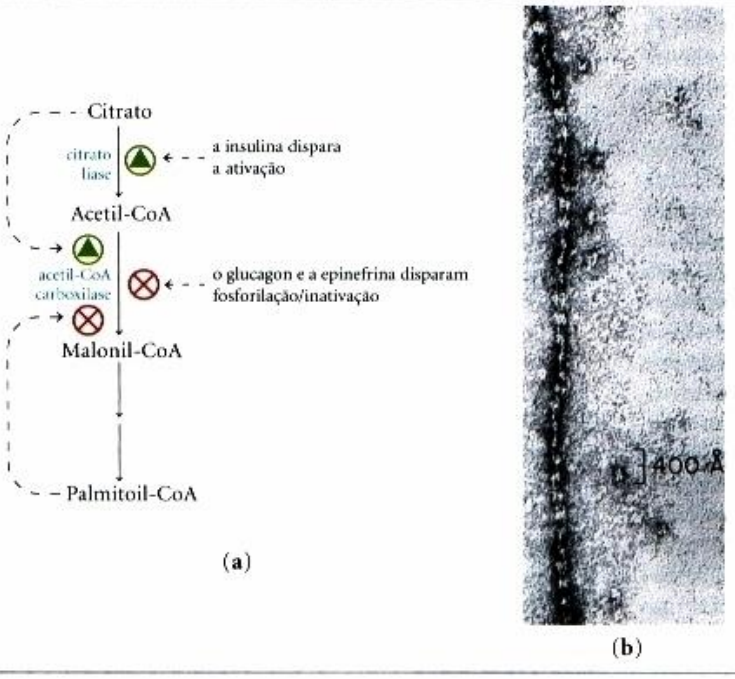

Citrato
citrato liase
a insulina dispara a ativação
Acetil-CoA
acetil-CoA carboxilase
o glucagon e a epinefrina disparam fosforilação/inativação
Malonil-CoA
Palmitoil-CoA
(a)
400 Å
(b)

Figura 21-12 – Regulação da síntese dos ácidos graxos. (**a**) Nas células dos vertebrados, tanto a regulação alostérica como a modificação covalente dependente de hormônios influenciam o fluxo de precursores para formação do malonil-CoA. Nos vegetais, a acetil-CoA carboxilase é ativada pelas variações na [Mg^{2+}] e do pH que acompanham a iluminação (não mostradas aqui). (**b**) Filamentos da acetil-CoA carboxilase (a forma ativa desfosforilada) como vistos ao microscópio eletrônico.

da concentração de Mg^{2+}, e ambos ocorrem quando a planta é iluminada (veja Fig. 20-35). As bactérias não empregam os triacilgliceróis para armazenamento de energia. O papel mais importante da síntese de ácidos graxos na *E. coli* é fornecer precursores para os lipídios das membranas e a regulação desse processo é muito complexa, envolvendo determinados nucleotídeos de guanina, como ppGpp, que coordenam o crescimento celular com a formação das membranas (veja Figs. 10-42 e 28-26).

Em adição à regulação "momento a momento" da atividade enzimática, essas vias também são reguladas em nível de expressão gênica. Por exemplo, quando animais ingerem um excesso de ácidos graxos poliinsaturados, é suprimida a expressão dos genes que codificam um largo espectro de enzimas lipogênicas no fígado. O mecanismo pelo qual esses genes são regulados ainda não está claro.

Se a síntese de ácidos graxos e a β-oxidação ocorressem simultaneamente, os dois processos constituiriam um ciclo fútil desperdiçador de energia. Notamos anteriormente (pág. 477) que a β-oxidação é bloqueada por malonil-CoA que inibe a carnitina aciltransferase I. Assim, durante a síntese de ácidos graxos, a produção do primeiro intermediário, o malonil-CoA, fecha a β-oxidação no nível do sistema de transporte na membrana mitocondrial interna. Este mecanismo de controle ilustra outra vantagem da segregação em diferentes compartimentos celulares das vias de síntese e de degradação.

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir do palmitato

O palmitato, o principal produto do sistema da ácido graxo sintase nas células animais, é o precursor de outros ácidos graxos de cadeia longa (Fig. 21-13). Ele pode ser aumentado para formar tanto o estearato (18:0) quanto ácidos graxos saturados ainda maiores, por adições posteriores de grupos acetil, por meio da ação dos **sistemas de alongamento dos ácidos graxos** presentes no retículo endoplasmático liso e na mitocôndria. O sistema de alongamento mais ativo do retículo endoplasmático aumenta a cadeia de 16 carbonos do palmitoil-CoA de dois carbonos, formando estearoil-CoA. Embora diferentes sistemas enzimáticos estejam envolvidos, e a coenzima A, e não a ACP, seja o transportador de acila diretamente envolvido na reação, o mecanismo de alongação é idêntico àquele empregado na síntese do palmitato: a doação de dois carbonos pelo malonil-ACP, seguida por redução, desidratação e redução ao produto saturado com 18 átomos de carbono, o estearoil-CoA.

Alguns ácidos graxos são dessaturados

O palmitato e o estearato servem como precursores dos dois ácidos graxos monoinsaturados mais comuns nos tecidos animais: o palmitoleato, 16:1(Δ^9) e o oleato, 18:1(Δ^9) (Fig. 21-13). Cada um desses ácidos graxos tem uma única dupla ligação *cis* na posição Δ^9 (entre C-9 e C-10). A dupla ligação é introduzida na cadeia do ácido graxo por uma reação oxidativa catalisado pela **acil-CoA graxo dessaturase** (Fig. 21-14). Essa enzima é um exemplo de uma **oxidase de função mista** (Adendo 21-1). Dois substratos diferentes, o ácido graxo e o NADPH, sofrem, simultaneamente, oxidação de dois elétrons. A via de fluxo dos elétrons inclui um citocromo (citocromo b_5) e uma flavoproteína (citocromo b_5 redutase), os quais, como a própria acil-CoA graxo dessaturase, estão presentes no retículo endoplasmático liso. Nas plantas, o oleato é produzido por uma estearoil-ACP dessaturase no estroma do cloroplasto que emprega ferrodoxina reduzida como doadora de elétrons.

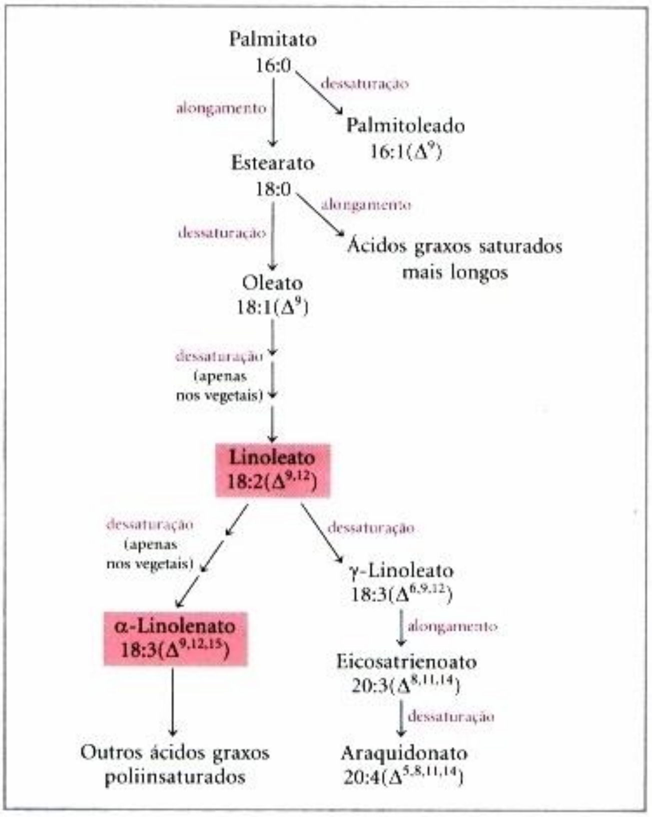


Figura 21-13 – Vias de síntese de outros ácidos graxos. O palmitato é o precursor do estearato e de ácidos graxos saturados com cadeia ainda mais longa, bem como dos ácidos monoinsaturados palmitoléico e oléico. Os mamíferos não podem converter oleato em linoleato ou α-linolenato (sombreado em vermelho), portanto eles são necessários na dieta como ácidos graxos essenciais. Nesta figura está esquematizada a conversão de linoleato em outros ácidos graxos poliinsaturados e eicosanóides. Os ácidos graxos insaturados são simbolizados pela indicação do número de carbonos e o número de posição das duplas ligações, como na Tabela 11-1.

Os hepatócitos de mamíferos podem introduzir rapidamente ligações duplas na posição Δ^9 dos ácidos graxos, mas não podem introduzir as duplas ligações adicionais na cadeia do ácido graxo entre C-10 e a extremidade metilterminal. O linoleato, 18:2 ($\Delta^{9,12}$) e o α-linolenato, 18:3 ($\Delta^{9,12,15}$), não podem ser sintetizados pelos mamíferos, mas as plantas podem sintetizar os dois. As dessaturases vegetais que introduzem ligações duplas nas posições Δ^{12} e Δ^{15} estão localizadas no retículo endoplasmático e no cloroplasto. Essas enzimas agem não em ácidos graxos livres, mas em um fosfolipídio, a fosfatidilcolina, contendo pelo menos um oleato ligado ao glicerol (Fig. 21-15). Ambos, vegetais e bactérias, precisam sintetizar ácidos graxos poliinsaturados para assegurar a fluidez de suas membranas em baixas temperaturas ambientes.

Como eles são precursores necessários para a síntese de outros produtos, o linoleato e o linolenato são **ácidos graxos essenciais** para os mamíferos; eles precisam ser obtidos de material alimentar vegetal. Uma vez ingerido, o linoleato pode ser convertido em alguns outros ácidos poliinsaturados, particularmente: γ-linolenato, eicosatrienoato e eicosatetraenoato (araquidonato), que podem ser feitos apenas do linoleato (Fig. 21-13). O araquidonato, 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$), é um precursor essencial de lipídios reguladores, os eicosanóides. Os ácidos graxos com 20 átomos de carbono são sintetizados do linoleato (e do linolenato) por meio de reações de alongamento de ácidos graxos análogas às descritas acima.

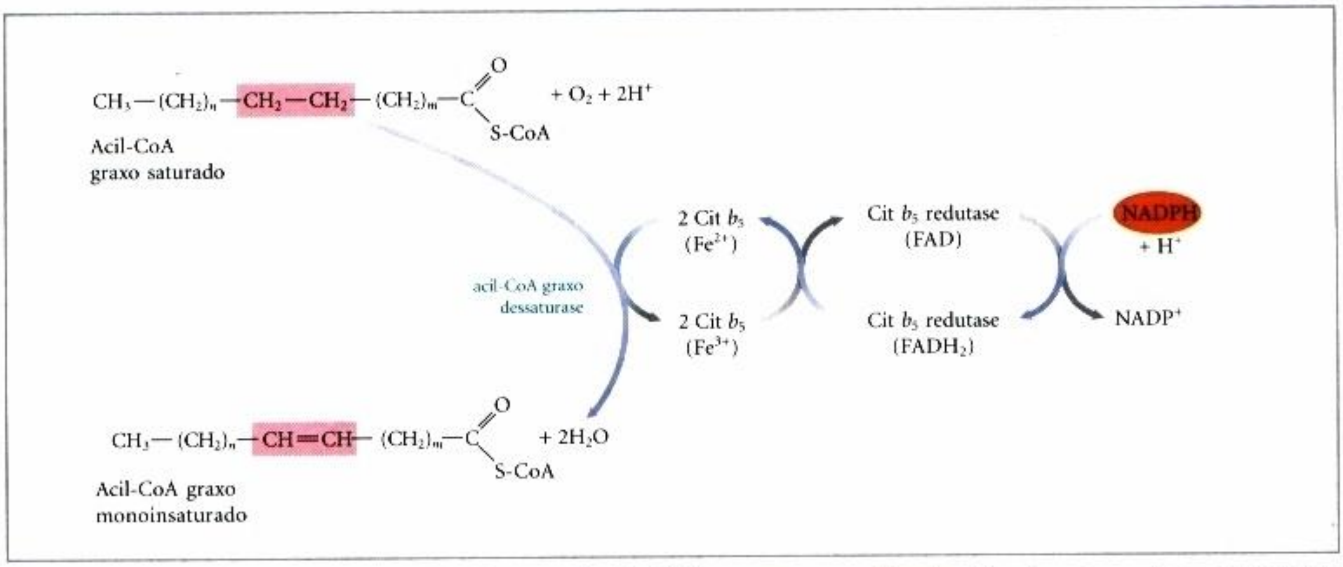

CH₃—(CH₂)ₙ—CH₂—CH₂—(CH₂)ₘ—C(=O)S-CoA + O₂ + 2H⁺
Acil-CoA
graxo saturado
acil-CoA graxo
dessaturase
2 Cit b₅
(Fe²⁺)
2 Cit b₅
(Fe³⁺)
Cit b₅ redutase
(FAD)
Cit b₅ redutase
(FADH₂)
NADPH
+ H⁺
NADP⁺
CH₃—(CH₂)ₙ—CH=CH—(CH₂)ₘ—C(=O)S-CoA + 2H₂O
Acil-CoA graxo
monoinsaturado

Figura 21-14 – A transferência de elétrons na dessaturação dos ácidos graxos em vertebrados. As setas azuis mostram o caminho dos elétrons quando dois substratos diferentes — um acil-CoA graxo e NADPH — são oxidados pelo oxigênio molecular. Estas reações ocorrem na face luminal do retículo endoplasmático liso. Uma via similar, mas com diferentes transportadores de elétrons, ocorre nos vegetais.

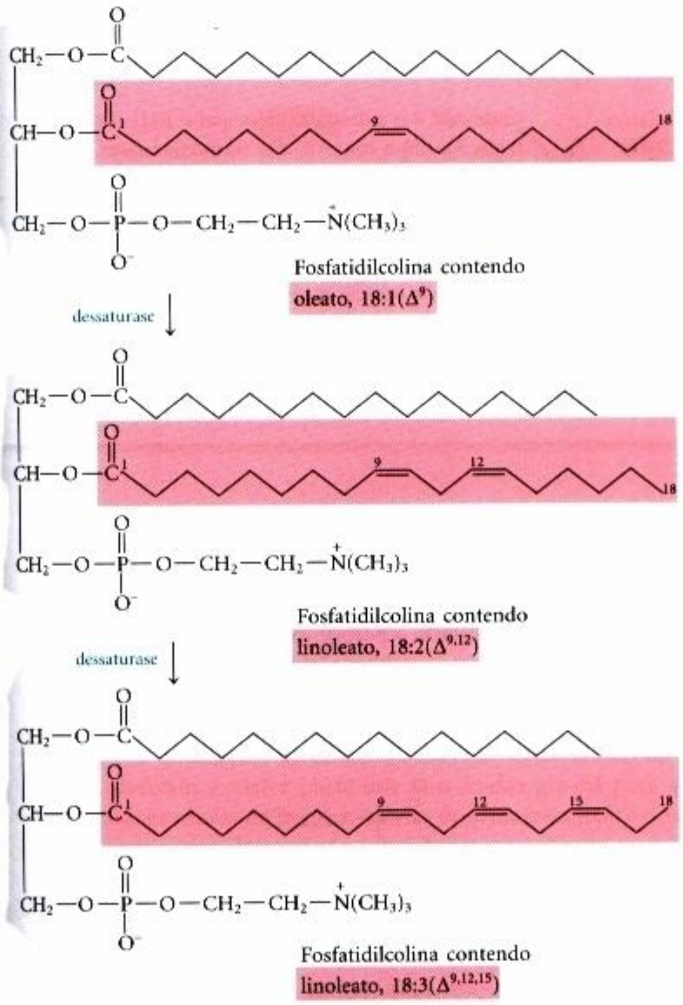

CH₂—O—C
CH—O—C
CH₂—O—P—O—CH₂—CH₂—N(CH₃)₃
1
9
12
15
18
Fosfatidilcolina contendo
oleato, 18:1(Δ⁹)
dessaturase
Fosfatidilcolina contendo
linoleato, 18:2(Δ⁹,¹²)
dessaturase
Fosfatidilcolina contendo
linoleato, 18:3(Δ⁹,¹²,¹⁵)

Figura 21-15 – Ação das dessaturases de vegetais. Nos vegetais, as dessaturases oxidam o oleato ligado à fosfatidilcolina, produzindo ácidos graxos poliinsaturados. Alguns dos produtos são liberados da fosfatidilcolina por hidrólise.

Os eicosanóides são formados a partir de ácidos graxos poliinsaturados com 20 átomos de carbono

Os eicosanóides são uma família de moléculas biológicas que agem como sinalizadores muito potentes e como mensageiros de curta distância, afetando os tecidos próximos das células que o produzem. Em resposta a um estímulo hormonal, ou a outros, a fosfolipase A_2, presente na maioria dos tipos celulares de mamíferos, ataca os fosfolipídios de membrana liberando o araquidonato, 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$), de sua ligação com o carbono do meio do glicerol. Um grupo de enzimas presentes no retículo endoplasmático liso converte o araquidonato em **prostaglandinas**, em um processo que se inicia com a formação de PGH_2, o precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e tromboxanos (Fig. 21-16a). As duas reações que levam até PGH_2 envolvem a adição de oxigênio molecular; ambos são catalisados por uma enzima bifuncional, **cicloxigenase (COX)** também chamada de **prostaglandina H_2 sintase**. No primeiro dos dois passos a atividade cicloxigenase introduz oxigênio molecular na molécula convertendo araquidonato em prostaglandina G_2 (PGG_2). O segundo passo, catalisado pela atividade de peroxidase da enzima bifuncional, converte PGG_2 em PGH_2. A aspirina (acetilsalicilato; Fig. 21-16b) inativa irreversivelmente essa enzima (impedindo assim a síntese de prostaglandinas e tromboxanos) por acetilação de um resíduo essencial de serina, o que bloqueia o sítio catalítico. O ibuprofeno, um antiinflamatório não-esteróide largamente usado (NSAID; Fig. 21-16c) é uma droga que também age por inibição da mesma enzima. A descoberta recente da existência de duas isozimas COX levou à esperança de que podem ser sintetizados novos NSAIDs com maior especificidade e sem os efeitos colaterais indesejáveis (Adendo 21-2).

A **tromboxano sintase** presente nas plaquetas sangüíneas (trombócitos) converte PGH_2 em tromboxano A_2, do qual outros **tromboxanos** são derivados (Fig. 21-16a). Os tromboxanos induzem à constrição dos vasos sangüíneos e à agregação das plaquetas, os primeiros passos na coagulação do sangue. Acredita-se que a ingestão regular de pequenas doses de aspirina reduzam a probabilidade de ocorrer ataques do coração e acidentes vasculares cerebrais, por redução da produção de tromboxano.

Adendo 21-1 Oxidases de função mista, oxigenases e citocromo P-450

Neste capítulo encontramos várias enzimas que realizam reações de oxidação-redução nas quais o oxigênio molecular é um dos participantes. A reação que introduz uma dupla ligação em um ácido graxo ou em uma cadeia acil-graxo (Fig. 21-14) é uma dessas reações.

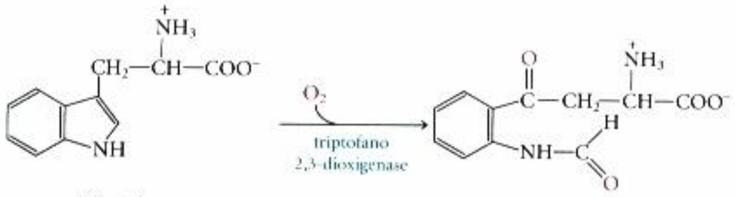
A nomenclatura das enzimas que catalisam reações desse tipo geral é freqüentemente confusa para os estudantes, assim como o seu mecanismo de ação. O termo **oxidase** é o nome geral para as enzimas que catalisam oxidações nas quais o oxigênio molecular é o receptor de elétrons, porém os átomos de oxigênio não aparecem no produto oxidado (porém, como veremos, existe uma exceção a essa "regra"!). A enzima que cria uma dupla ligação no acil-CoA graxo durante a oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos (veja Fig. 17-12) é uma oxidase desse tipo, como também o é a citocromo oxidase da cadeia de transferência de elétrons mitocondrial (veja Fig. 19-13). No primeiro caso, a transferência de dois elétrons para a H_2O produz peróxido de hidrogênio, H_2O_2; no segundo, dois elétrons reduzem $\frac{1}{2}O_2$ para H_2O. Muitas oxidases, mas não todas, são flavoproteínas.

As **oxigenases** catalisam as reações oxidativas nas quais os átomos de oxigênio *são* incorporados diretamente na molécula do substrato, formando um novo grupo hidroxila ou carboxila, por exemplo. As **dioxigenases** catalisam as reações nas quais ambos os átomos de oxigênio do O_2 são incorporados na molécula do substrato orgânico. Um exemplo de uma dioxigenase é o triptofano 2,3-dioxigenase, que catalisa a abertura do anel de cinco átomos do triptofano durante o catabolismo desse aminoácido. Quando essa reação ocorre na presença de $^{18}O_2$, os átomos de oxigênio isotópicos são encontrados nos dois grupos carbonila do produto (mostrados em vermelho).

As **monoxigenases**, que são mais abundantes e mais complexas em sua ação, catalisam reações nas quais apenas um dos dois átomos de oxigênio do O_2 é incorporado no substrato orgânico, o outro sendo reduzido a H_2O. As monoxigenases necessitam de dois substratos para funcionar como redutores dos dois átomos de O_2. O substrato principal aceita um dos dois átomos de oxigênio, e um co-substrato fornece átomos de hidrogênio para reduzir o outro átomo de oxigênio até H_2O. A equação geral da reação para as monoxigenases é:

$$AH + BH_2 + O{-}O \longrightarrow A{-}OH + B + H_2O$$

onde AH é o substrato principal e BH_2 o co-substrato. Como a maioria das monoxigenases catalisa reações nas quais o substrato principal torna-se hidroxilado, elas também são chamadas de **hidroxilases**. Algumas vezes são, também, chamadas de **oxidases de função mista** ou **oxigenases de função mista**, para indicar que oxidam dois substratos diferentes simultaneamente (note que o emprego de "oxidase" é um desvio do significado geral desse termo).

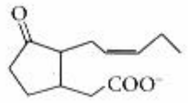


Triptofano

N-Formilquinurenina

Os tromboxanos, como as prostaglandinas, contêm um anel de cinco ou seis átomos, e a via que leva do araquidonato até essas duas classes de compostos é, às vezes, chamada de via "cíclica", para distingui-la da via "linear", que leva do araquidonato até os **leucotrienos** que são lineares (Fig. 21-17). A síntese dos leucotrienos começa com a ação de várias lipoxigenases que catalisam a incorporação de oxigênio molecular no araquidonato. Essas enzimas, encontradas nos leucócitos, coração, cérebro, pulmão e baço, são oxidases de função mista que empregam o citocromo P-450 (Adendo 21-1). Os vários leucotrienos diferem na posição do peróxido que é introduzido por essas lipoxigenases. Essa via linear do araquidonato, diferentemente das vias cíclicas, não é inibida pela aspirina ou por outras drogas antiinflamatórias não-esteróides.

Também os vegetais fazem derivar dos ácidos graxos substâncias sinalizadoras importantes. Como nos animais, um passo-chave na iniciação da sinalização envolve a ativação de uma fosfolipase específica. Nas plantas, o ácido graxo produzido é o linolenato. Uma lipoxigenase catalisa então o primeiro passo em um via que converte linolenato em jasmonato (Fig. 21-13). Funções sinalizadoras do jasmonato foram identificadas na defesa contra insetos, resistência a patógenos fúngicos e na maturação do pólen. O jasmonato também afeta a germinação das sementes, o crescimento das raízes e o desenvolvimento de frutos e sementes.



Jasmonato

Biossíntese dos Triacilgliceróis

A maior parte dos ácidos graxos sintetizados ou ingeridos por um organismo tem um de dois destinos: incorporação em triacilgliceróis para armazenamento de energia metabólica ou in-

Dependendo da natureza do co-substrato, existem diferentes classes de monoxigenases. Algumas usam flavina nucleotídeos reduzidos ($FMNH_2$ ou $FADH_2$), outras usam NADH ou NADPH e, ainda, outras usam α-cetoglutarato como co-substrato. A enzima que hidroxila o anel fenil da fenilalanina para formar a tirosina é uma monoxigenase que tem como co-substrato a tetraidrobiopterina (veja Fig. 18-22). Esta é a enzima defeituosa na doença genética humana chamada fenilcetonúria.

As reações de monoxigenação mais numerosas e mais complexas são aquelas que empregam um tipo de heme-proteína chamada **citocromo P-450**. Em geral, esse tipo de citocromo está presente no retículo endoplasmático liso e não nas mitocôndrias. Como a citocromo oxidase mitocondrial, o citocromo P-450 pode reagir com o O_2 e com o monóxido de carbono, mas pode ser diferenciado da citocromo oxidase porque o complexo de sua forma reduzida com o monóxido de carbono exibe uma forte absorção luminosa em 450nm; daí o nome P-450.

O citocromo P-450 catalisa as reações de hidroxilação nas quais um substrato orgânico RH é hidroxilado para R—OH incorporando um átomo de oxigênio do O_2; o outro átomo de oxigênio é reduzido até H_2O pelos equivalentes redutores fornecidos pelo NADH ou NADPH, mas usualmente passados para o P-450 por uma proteína ferro-enxofre. A Figura 1 mostra um esquema simplificado do mecanismo da ação do citocromo P-450, o qual tem passos intermediários ainda não completamente entendidos.

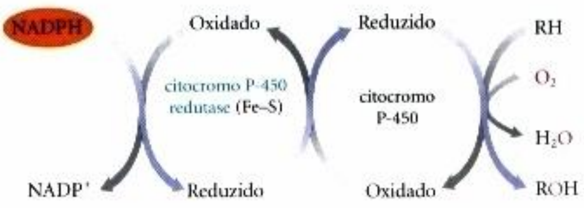


Figura 1

Na realidade o citocromo P-450 é uma família de proteínas muito semelhantes entre si; várias centenas de membros dessa família de proteínas já são conhecidas, cada uma com diferente especificidade para o substrato. No córtex adrenal um citocromo P-450 específico participa na hidroxilação dos esteróides para liberar os hormônios adrenocorticais, por exemplo (Fig. 21-44). O citocromo P-450 também é importante na hidroxilação de muitas drogas diferentes, como os barbituratos e outros xenobióticos (substâncias que são estranhas ao organismo), particularmente se elas são hidrofóbicas e relativamente insolúveis. O carcinógeno ambiental benzo[α]pireno (encontrado na fumaça do cigarro) sofre, no curso de sua detoxificação, uma hidroxilação que é dependente do citocromo P-450. A hidroxilação de compostos estranhos ao organismo transformam esses compostos em substâncias mais solúveis em água, o que permite sua eliminação na urina. Infelizmente, a hidroxilação de alguns compostos os convertem em substâncias tóxicas, subvertendo o sistema de detoxicação.

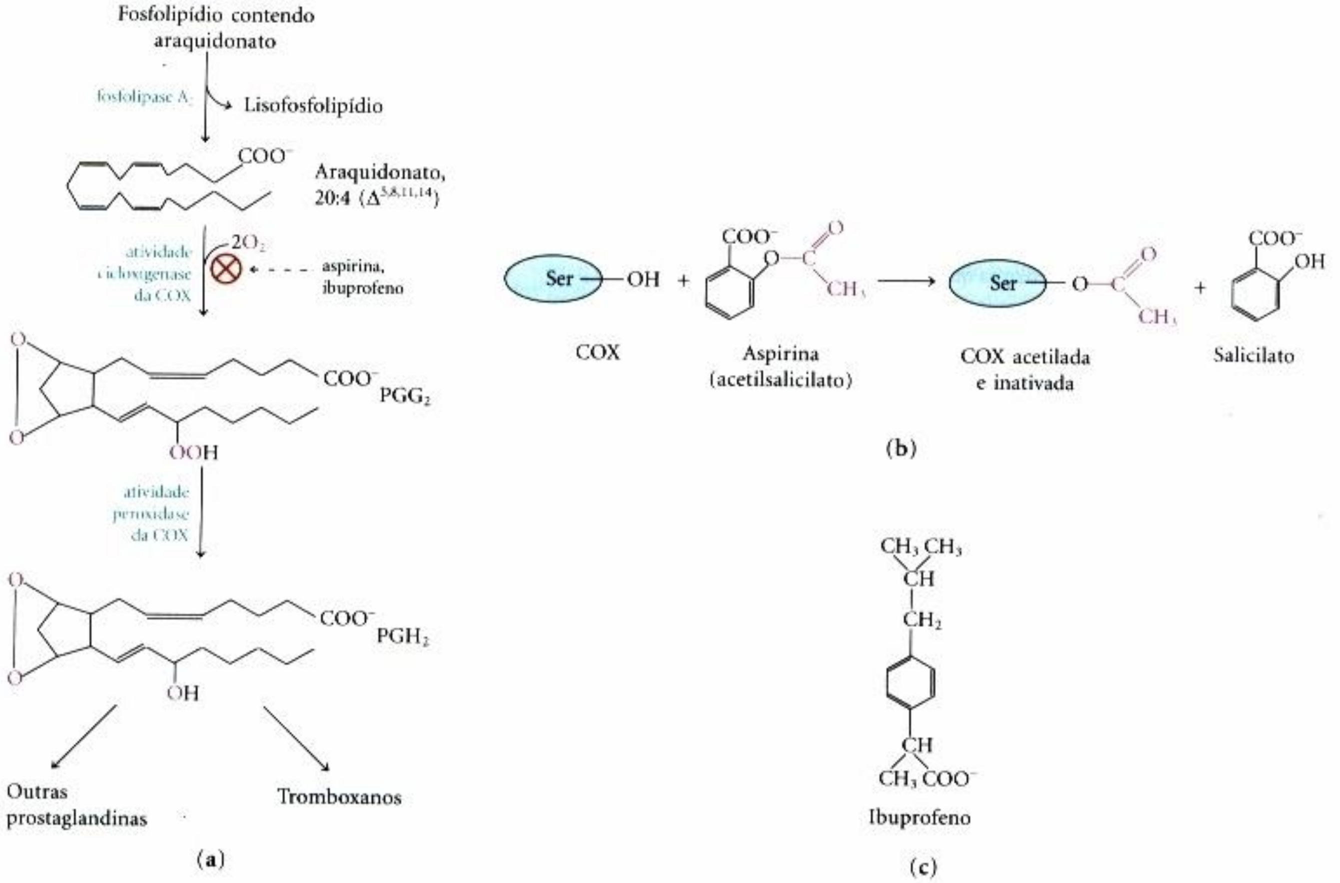
As reações descritas neste capítulo, catalisadas por oxidases de função mista, são aquelas envolvidas na dessaturação do acil-CoA graxo (Fig. 21-14); síntese de leucotrienos (Fig. 21-17), síntese de plasmalogênios (Fig. 21-28), conversão do esqualeno em colesterol (Fig. 21-35) e síntese de hormônios esteróides (Fig. 21-44).

corporação em fosfolipídios componentes de membranas. A repartição entre esses dois destinos alternativos depende das necessidades do organismo. Durante o crescimento corporal rápido, a síntese de novas membranas requer a síntese de fosfolipídios de membrana; os organismos que dispõem de um suprimento abundante de alimento, mas não estão em crescimento, derivam a maior parte dos seus ácidos graxos para a síntese das gorduras de reserva. As vias de armazenamento dos lipídios e as várias classes de fosfolipídios de membrana começam no mesmo ponto: a formação de ésteres acil-graxos do glicerol. Discutiremos primeiro a via até os triacilgliceróis e sua regulação.

Os triacilgliceróis e os glicerofosfolipídios são sintetizados a partir dos mesmos precursores

Os animais podem sintetizar e armazenar grandes quantidades de triacilgliceróis para o seu emprego posterior como combustíveis (veja Adendo 17-1). Os humanos podem armanezar apenas poucas centenas de gramas de glicogênio nas células musculares e do fígado, uma quantidade apenas suficiente para suprir as necessidades de energia corporal por 12 horas. Em contraste, a quantidade total de triacilgliceróis em um homem de 70kg e compleição média é perto de 15kg, o suficiente para suprir as necessidades basais de energia por 12 semanas (veja Tabela 23-4). Os triacilgliceróis possuem o mais alto conteúdo em energia dos nutrientes armazenados — mais do que ~38kJ/g. Sempre que os carboidratos são ingeridos além da capacidade de armazenamento na forma de glicogênio, eles são convertidos em triacilgliceróis e armazenados no tecido adiposo. As plantas também produzem triacilgliceróis como combustível rico em energia, que são armazenados, principalmente, nas frutas e sementes.

Os triacilgliceróis e os glicerofosfolipídios, como a fosfatidiletanolamina, compartilham dois precursores (os acil-CoA graxos e o glicerol-3-fosfato) e vários passos enzimáticos em suas respectivas vias de biossíntese nos tecidos animais. O glicerol-3-


Fosfolipídio contendo araquidonato
fosfolipase A₂
Lisofosfolipídio
COO⁻
Araquidonato, 20:4 (Δ5,8,11,14)
atividade cicloxigenase da COX
2O₂
aspirina, ibuprofeno
COO⁻
PGG₂
OOH
atividade peroxidase da COX
COO⁻
PGH₂
OH
Outras prostaglandinas
Tromboxanos
Ser
OH
COO⁻
O
CH₃
COX
Aspirina (acetilsalicilato)
COX acetilada e inativada
Salicilato
CH₃ CH₃
CH
CH₂
CH
CH₃ COO⁻
Ibuprofeno

(a) (b) (c)

Figura 21-16 – A via "cíclica" do araquidonato até prostaglandinas e tromboxanos. (**a**) Depois que a fosfolipase A_2 libera o araquidonato, as atividades de cicloxigenase e de peroxidase da COX (também chamada de prostaglandina sintase H_2) catalisam a produção de PGH_2, a precursora das demais prostaglandinas e tromboxanos. (**b**) A aspirina inibe a primeira reação por acetilação de um resíduo essencial de serina da enzima. (**c**) O ibuprofeno também inibe esse passo, provavelmente por mimetizar a estrutura do substrato ou de um intermediário na reação.

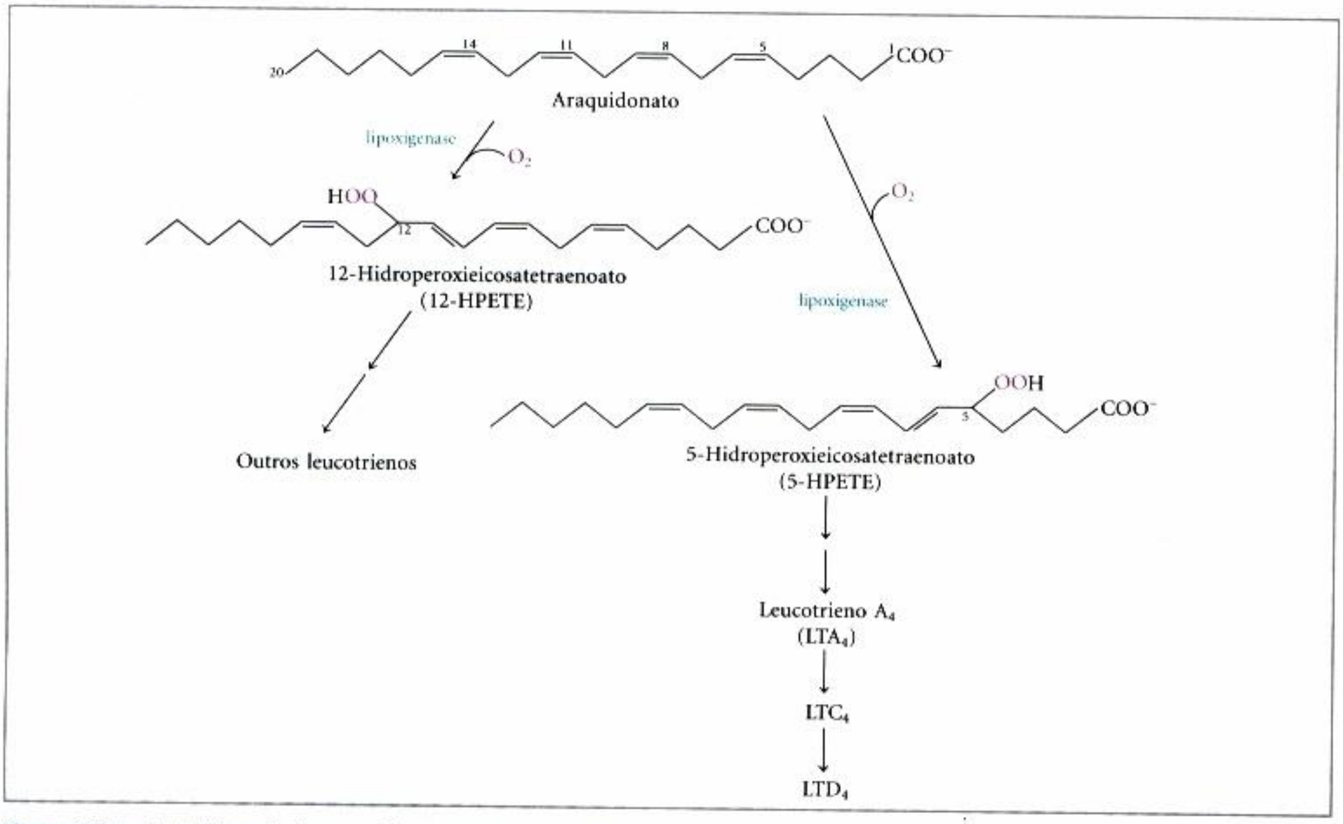

20
14
11
8
5
1
COO⁻
Araquidonato
lipoxigenase
O₂
HOO
12
COO⁻
12-Hidroperoxieicosatetraenoato (12-HPETE)
O₂
lipoxigenase
Outros leucotrienos
OOH
5
COO⁻
5-Hidroperoxieicosatetraenoato (5-HPETE)
Leucotrieno A₄ (LTA₄)
LTC₄
LTD₄

Figura 21-17 – A via "linear" do araquidonato até leucotrienos.

fosfato pode ser formado de duas maneiras (Fig. 21-18). Ele pode ser gerado da diidroxiacetona fosfato que aparece durante a glicólise pela ação da **glicerol-3-fosfato desidrogenase** citosólica ligada ao NAD; no fígado e no rim ele também é formado do glicerol pela ação da **glicerol quinase**. Os outros precursores dos triacilgliceróis são os acil-CoA graxos, formados dos ácidos graxos pelas **acil-CoA sintetases** (Fig. 21-18), as mesmas enzimas responsáveis pela ativação dos ácidos graxos para a β-oxidação (veja Fig. 17-5).

O primeiro estágio na biossíntese dos triacilgliceróis é a acilação dos dois grupos hidroxila livres do L-glicerol-3-fosfato por duas moléculas de acil-CoA graxo para liberar o **diacilglicerol-3-fosfato**, comumente chamado de **ácido fosfatídico** ou ácido fosfadidato (Fig. 21-18). Embora o ácido fosfatídico ocorra apenas em quantidades muito pequenas nas células, ele é um intermediário central na biossíntese dos lipídios e pode ser convertido tanto em triacilgliceróis como em glicerofosfolipídios. Na via que leva aos triacilgliceróis, o ácido fosfatídico é hidrolisado pelo **ácido fosfatídico fosfatase** para formar um 1,2-diacilglicerol (Fig. 21-19). Os diacilgliceróis são então convertidos em triacilgliceróis por transesterificação com um terceiro acil-CoA graxo.

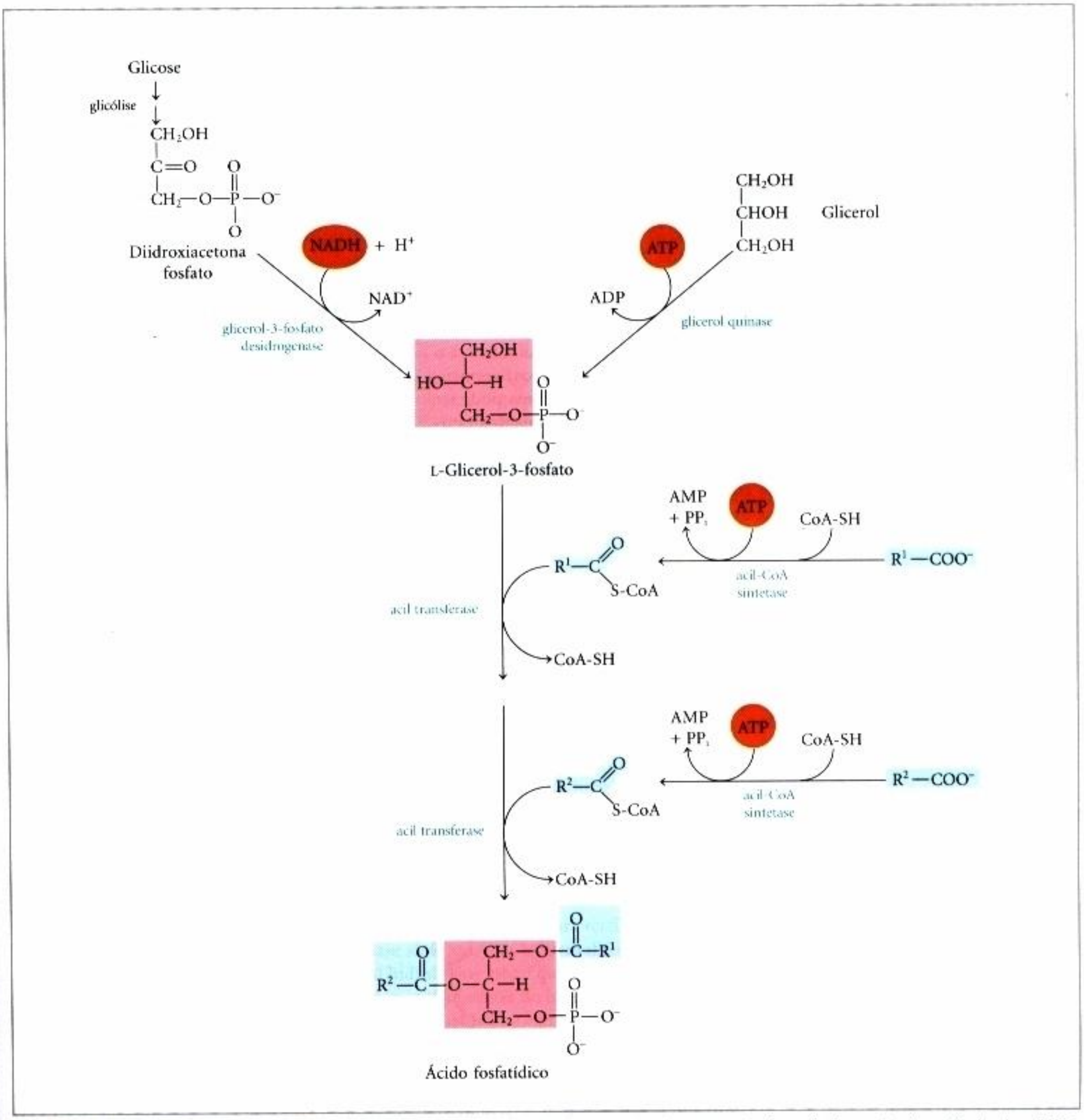

Glicose
glicólise
Diidroxiacetona fosfato
NADH
+ H+
NAD+
glicerol-3-fosfato desidrogenase
Glicerol
ATP
ADP
glicerol quinase
L-Glicerol-3-fosfato
AMP + PPi
ATP
CoA-SH
acil-CoA sintetase
R¹—COO⁻
S-CoA
acil transferase
CoA-SH
AMP + PPi
ATP
CoA-SH
acil-CoA sintetase
R²—COO⁻
S-CoA
acil transferase
CoA-SH
Ácido fosfatídico

Figura 21-18 – A via biossintética do ácido fosfatídico. Os grupos acil-graxos são primeiramente ativados pela formação de moléculas de acil-CoA graxo que depois são transferidas para uma ligação éster com o L-glicerol-3-fosfato, formado em uma ou outra das duas vias mostradas. O ácido fosfatídico é mostrado aqui com a estereoquímica correta em C-2 da molécula do glicerol. Para economia de espaço nas figuras subseqüentes (e também na Fig. 21-15), ambos os grupos acil-graxos dos glicerofosfolipídios e todos os três grupos acila dos triacilgliceróis são mostrados projetando-se para a direita.

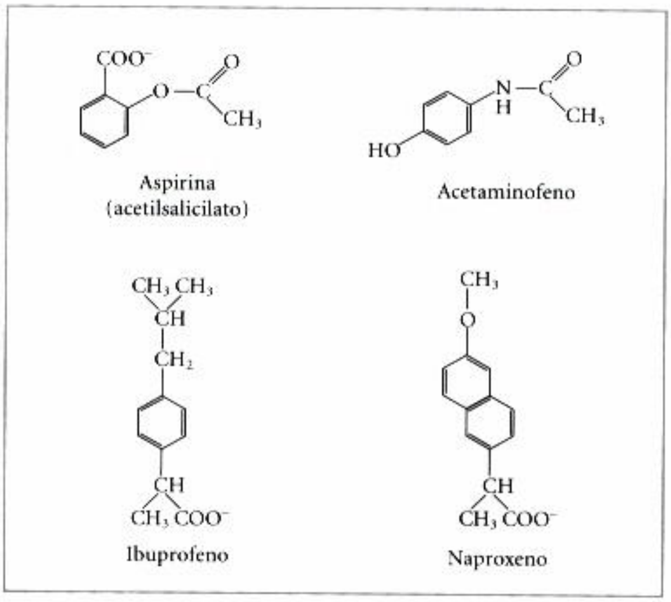
Adendo 21-2

Cicloxigenases isozimas e a pesquisa por uma aspirina melhor: o alívio está no sítio ativo

Em todo o mundo, *milhares de toneladas* de aspirina (acetilsalicilato) são consumidas todos os anos para o alívio de dores de cabeça, músculos doloridos, articulações inflamadas e febre. Como a aspirina também inibe a agregação de plaquetas e a coagulação do sangue, ela tambem é empregada em doses pequenas para tratar pacientes com risco de sofrer infarto do miocárdio. As propriedades medicinais das substâncias conhecidas como salicilatos, inclusive a aspirina, foram descritas pela primeira vez pela ciência ocidental em 1763 quando, na Inglaterra, Edmond Stone notou que a casca do salgueiro *Salix alba* era efetiva contra febres e dores. Por volta de 1830 os químicos alemães purificaram os componentes ativos extraídos do salgueiro e de outra planta rica em salicilatos, o arbusto *Spiraea ulmaria*. Na virada do século, a aspirina (nome formado por *a* de acetil e *spir* de *Spirsäure*, palavra alemã que designa o ácido retirado da *Spiraea*) já era largamente empregada. A aspirina é uma das substâncias NSAID, sigla formada de parte das palavras inglesas "*n*on*s*teroidal *a*nti-inflamatory *d*rugs" (drogas antiinflamatórias não-esteróides); outras drogas desse grupo são o ibuprofeno, o acetaminofeno e o naproxeno (Figura 1), todos eles vendidos livremente de forma legal. Infelizmente a aspirina pode ter efeitos colaterais graves como sangramentos estomacais, insuficiência renal e, em casos extremos, morte. Em breve, novas NSAIDs com os efeitos benéficos da aspirina mas sem seus colaterais indesejáveis estarão à disposição da medicina.

A aspirina e outras NSAIDs inibem a atividade da cicloxigenase da prostaglandina H_2 sintase (também chamada COX, de cicloxigenase) que adiciona oxigênio molecular ao araquidonato para iniciar a síntese das prostaglandinas (veja Fig. 21-16a). As prostaglandinas regulam muitos processos fisiológicos incluindo: agregação das plaquetas, contração uterina, dor, inflamação e secreção de mucinas que protegem a mucosa gástrica contra o ácido e as enzimas proteolíticas secretados no estômago. A irritação estomacal que é um efeito secundário comum nos tratamentos com a aspirina resulta de sua interferência com a secreção da mucina gástrica.

Nos mamíferos existem duas isozimas da prostaglandina H_2 sintase, COX-1 e COX-2. Elas têm funções diferentes mas seqüências de aminoácidos muito similares (idênticas em 60% a 65%) e mecanismo de reação também similar em ambos os centros catalíticos. A COX-1 é responsável pela síntese das prostaglandinas que regulam a secreção da mucina gástrica e a COX-2 pelas prostaglandinas que fazem a intermediação dos processos como inflamação, dor e febre. A aspirina inibe as duas isozimas quase igualmente, assim, somente uma dose que seja suficiente para reduzir um processo inflamatório também poderá provocar irritação da mucosa do estômago. Numerosas pesquisas são atualmente dirigidas para o desenvolvimento de novas NSAIDs que sejam inibidores específicos da COX-2 e várias delas deverão estar disponíveis.



Aspirina
(acetilsalicilato)

Acetaminofeno

Ibuprofeno

Naproxeno

Figura 1

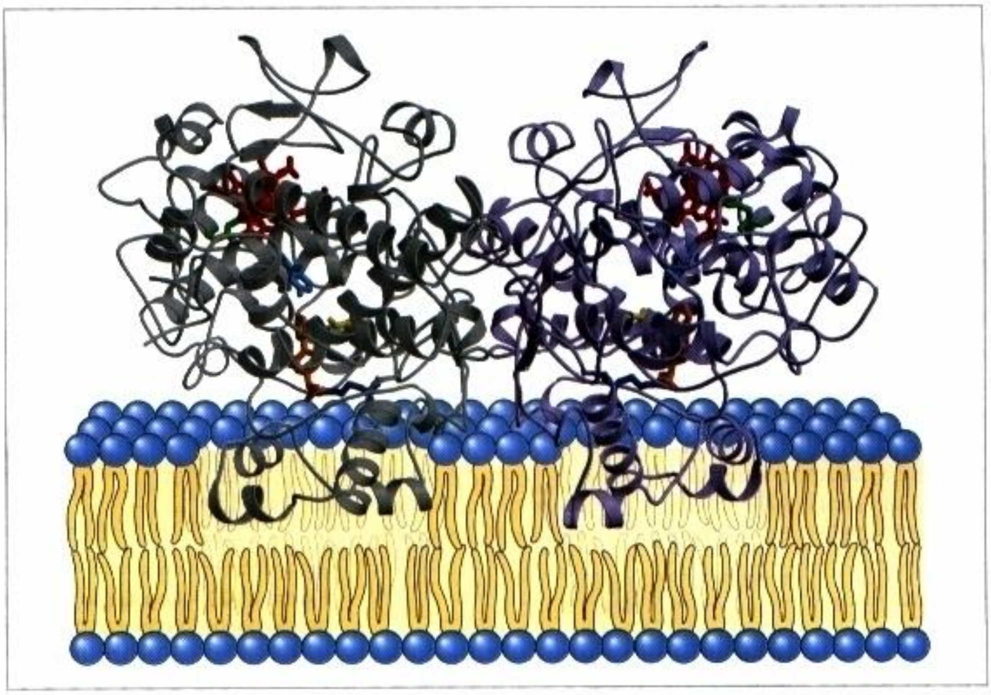
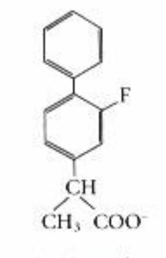


Figura 2 – Estrutura da COX-1 determinada por cristalografia de raios X. Esta enzima é composta por dois monômeros idênticos (azul e cinza), cada um deles contendo três domínios: uma âncora consistindo de quatro hélices anfipáticas, um segundo domínio que de alguma forma se parece a um domínio do fator de crescimento epidérmico, o domínio catalítico contendo as atividades de cicloxigenase e peroxidase bem como o canal hidrofóbico no qual o substrato (araquidonato) se liga. O heme que é parte do sítio ativo da peroxidase está em vermelho e um resíduo importante (Tyr^{385}) no sítio ativo da cicloxigenase está em cor azul-turquesa. Outros resíduos catalíticos importantes incluem: Arg^{120} (azul-escuro), His^{388} (verde) e Ser^{530} (amarelo). Um inibidor, a droga antiinflamatória não-esteróide inibidora (fluorbiprofeno; em alaranjado), bloqueia de forma evidente o acesso ao sítio de ligação do substrato.

O desenvolvimento de inibidores específicos da COX-2 tem sido auxiliado pelo conhecimento detalhado da estrutura tridimensional da COX-1 (Figura 2). Essa proteína é um homodímero. Cada monômero (M_r 70.000) tem um domínio anfipático (alaranjado) que penetra mas não atravessa a membrana do retículo endoplasmático; isso ancora a enzima no lado luminal do retículo (uma topologia incomum — em geral as regiões hidrofóbicas de proteínas integrais de membrana atravessam toda a bicamada). Os dois sítios catalíticos estão no domínio globular (azul) projetando-se no lúmen do retículo endoplasmático.

Ambas, COX-1 e COX-2, têm estrutura terciária e quaternária quase idênticas, mas existem diferenças sutis no canal hidrofóbico longo que se estende da membrana interior à superfície do lúmen. O canal inclui os dois sítios catalíticos e é presumido ser o sítio de ligação para o substrato hidrofóbico, o araquidonato. É possível localizar o sítio de ligação para as NSAIDs por meio da cristalização da COX-1 na presença de uma dessas substâncias, o fluorbiprofeno. Ligada à enzima, essa droga bloqueia o canal hidrofóbico e impede a entrada do araquidonato. As diferenças sutis entre os canais da COX-1 e da COX-2 podem permitir projetar uma NSAID que se adapte perfeitamente ao canal de uma mas não ao da outra e, assim, inibir uma dessas enzimas com eficiência muito maior. *In vitro*, algumas drogas potenciais discriminam entre COX-1 e COX-2 por um fator de 1.000 vezes. O emprego de informações precisas sobre a estrutura do sítio ativo de uma enzima é um instrumento poderoso no desenvolvimento de drogas melhores e mais específicas.



Fluorbiprofeno

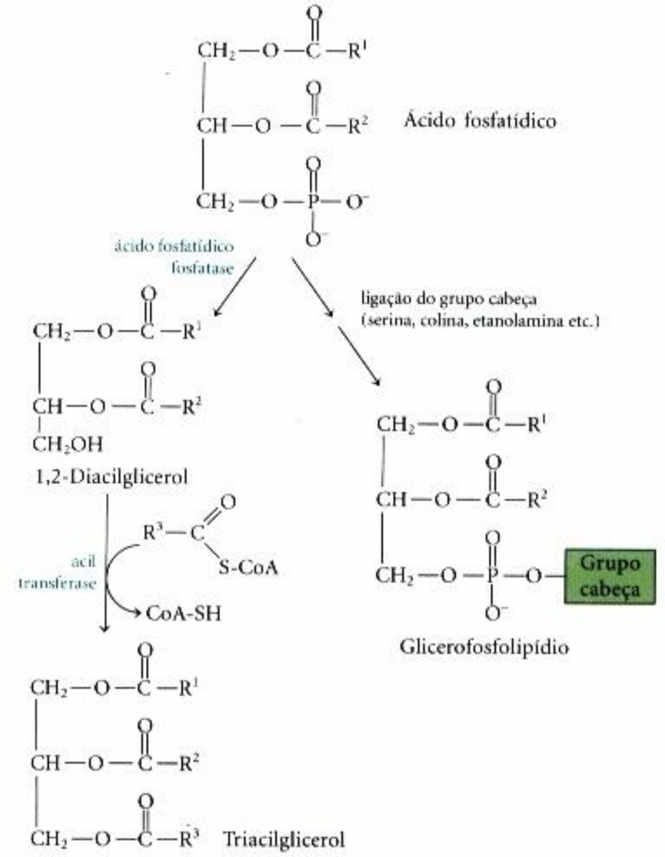


Figura 21-19 – O ácido fosfatídico na biossíntese de lipídios. O ácido fosfatídico é o precursor dos triacilgliceróis e dos glicerofosfolipídios. Os mecanismos para a ligação do grupo cabeça durante a síntese de fosfolipídios serão descritos adiante.

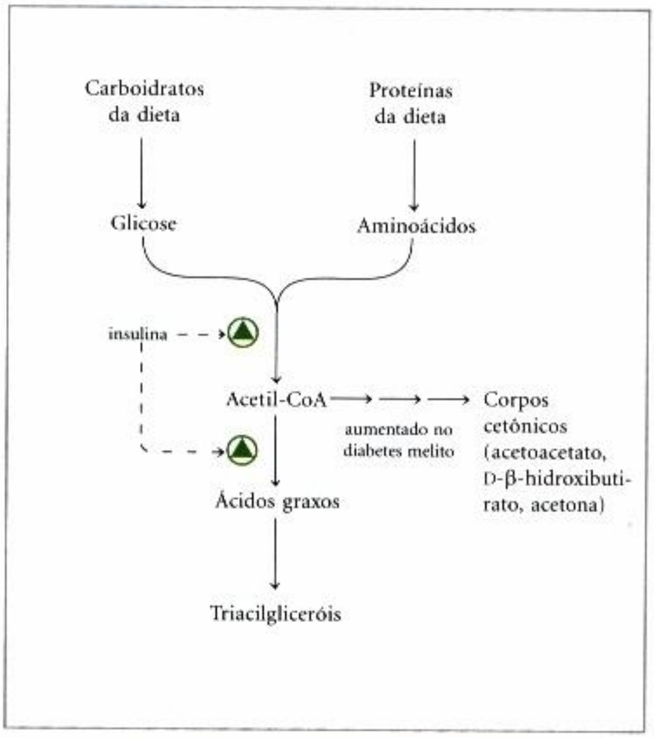


Figura 21-20 – Regulação da síntese de triacilgliceróis pela insulina. A insulina estimula a conversão em gordura dos carboidratos e das proteínas da alimentação. Nos indivíduos com diabetes melito não-tratado ocorre a falta desse hormônio e, devido a isso, ocorre a diminuição da síntese dos ácidos graxos, nessas condições o acetil-CoA proveniente do catabolismo dos carboidratos e das proteínas é derivado para a produção dos corpos cetônicos. As pessoas com cetose severa cheiram à acetona e, às vezes, seu estado é confundido com o de embriaguez (veja pág. 693).

Nos animais a biossíntese dos triacilgliceróis é regulada por hormônios

Na espécie humana a massa da gordura corporal pode permanecer quase constante durante longos períodos, embora possam ocorrer algumas variações em espaço de tempo curto, na mesma medida das flutuações da ingestão calórica durante esse tempo. Entretanto, se carboidratos, gorduras ou proteínas forem consumidos em quantidades que excedam as necessidades energéticas, o excesso será armazenado na forma de triacilgliceróis. A gordura estocada por esse processo pode ser retirada e consumida para o fornecimento de energia e capacita o organismo a suportar períodos de jejum mais ou menos longos.

A biossíntese e a degradação dos triacilgliceróis são reguladas reciprocamente, com a concessão da preferência para uma das vias dependendo das necessidades metabólicas do momento considerado e dos recursos disponíveis nas fontes metabólicas de fornecimento. A velocidade da biossíntese de triacilgliceróis é muito alterada pela ação de vários hormônios. A insulina, por exemplo, promove a conversão de carboidratos em triacilgliceróis (Fig. 21-20). Pessoas com diabetes melito severo, devido à falha da secreção de insulina ou da sua ação, não só são incapazes de utilizar a glicose adequadamente, como também falham em sintetizar ácidos graxos a partir de carboidratos ou aminoácidos. Mostram velocidades aumentadas da oxidação das gorduras, da formação de corpos cetônicos (Capítulo 17) e, por isso, elas perdem peso. O metabolismo dos triacilgliceróis também é influenciado pelo glucagon (Capítulo 23), pelo hormônio de crescimento da hipófise e pelos hormônios adrenocorticais.

Biossíntese dos Fosfolipídios de Membranas

No Capítulo 11 introduzimos duas classes principais de fosfolipídios de membranas: os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios. Notamos que várias espécies de fosfolipídios diferentes podem ser construídas pela combinação dos vários ácidos graxos e grupos cabeça polares com os esqueletos do glicerol ou da esfingosina (veja Figs. 11-8 e 11-10). Embora o número de produtos finais diferentes da biossíntese dos fosfolipídios seja grande, todos eles são sintetizados de acordo com alguns poucos padrões básicos que serão descritos neste tópico. Em geral, a montagem dos fosfolipídios, a partir de precursores simples, requer: (1) síntese de uma molécula esqueleto (o glicerol ou a esfingosina); (2) ligação de ácidos graxos ao esqueleto, por meio de ligações éster ou amida; (3) adição de um grupo cabeça hidrofílico, unido ao esqueleto por meio de uma ligação fosfodiéster; e, finalmente, em alguns casos, (4) alteração ou mudança do grupo cabeça para liberar o produto fosfolipídico final.

Nas células eucarióticas, a síntese de fosfolipídios ocorre primariamente na superfície do retículo endoplasmático liso e na membrana interna da mitocôndria. Alguns fosfolipídios recém-sintetizados permanecem naquela membrana, mas a maioria é destinada para outras localizações celulares. O processo pelo qual os fosfolipídios insolúveis em água se movem do sítio de sua síntese para aquele de sua função final não é totalmente compreendido, mas concluiremos discutindo alguns mecanismos propostos em anos recentes.

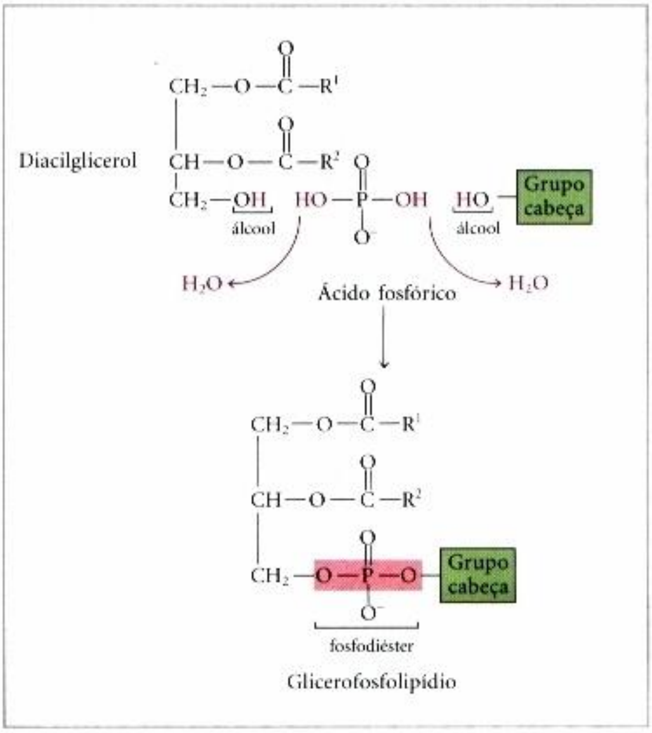

Diacilglicerol
álcool
álcool
Grupo cabeça
H_2O
Ácido fosfórico
H_2O
Grupo cabeça
fosfodiéster
Glicerofosfolipídio

Figura 21-21 – O grupo cabeça fosfolipídico é ligado ao diacilglicerol por uma ligação fosfodiéster, formada quando o ácido fosfórico se condensa com dois álcoois, eliminando duas moléculas de H_2O.

Existem duas estratégias para a ligação dos grupos cabeça

Os primeiros passos na síntese dos glicerofosfolipídios são compartilhados com a via que leva aos triacilgliceróis (Fig. 21-19): dois grupos acil-graxos são esterificados em C-1 e C-2 do L-glicerol-3-fosfato para formar o ácido fosfatídico. Freqüente mas não invariavelmente, o ácido graxo em C-1 é saturado e aquele em C-2 é insaturado. Uma segunda via para o ácido fosfatídico é a fosforilação de um diacilglicerol por uma quinase específica.

O grupo cabeça polar dos glicerofosfolipídios é ligado por meio de uma ligação fosfodiéster, na qual cada uma das hidroxilas alcoólicas (uma no grupo cabeça polar e uma no C-3 do glicerol) forma um éster com um ácido fosfórico (Fig. 21-21). No processo biossintético, uma das hidroxilas é ativada primeiro pela ligação de um nucleotídeo, a citidina difosfato (CDP). A citidina monofosfato (CMP) é então deslocada em um ataque nucleofílico pela outra hidroxila (Fig. 21-22). A CDP é ligada ou ao diacilglicerol, formando o ácido fosfatídico ativado, **CDP-diacilglicerol** (estratégia 1), ou ao grupo hidroxila do grupo cabeça (estratégia 2). As células eucarióticas empregam as duas estratégias, mas os procariotos usam apenas a primeira. A importância central dos nucleotídeos de citidina na biossíntese de lipídios foi descoberta por Eugene P. Kennedy, no início da década de 1960.

Eugene P. Kennedy

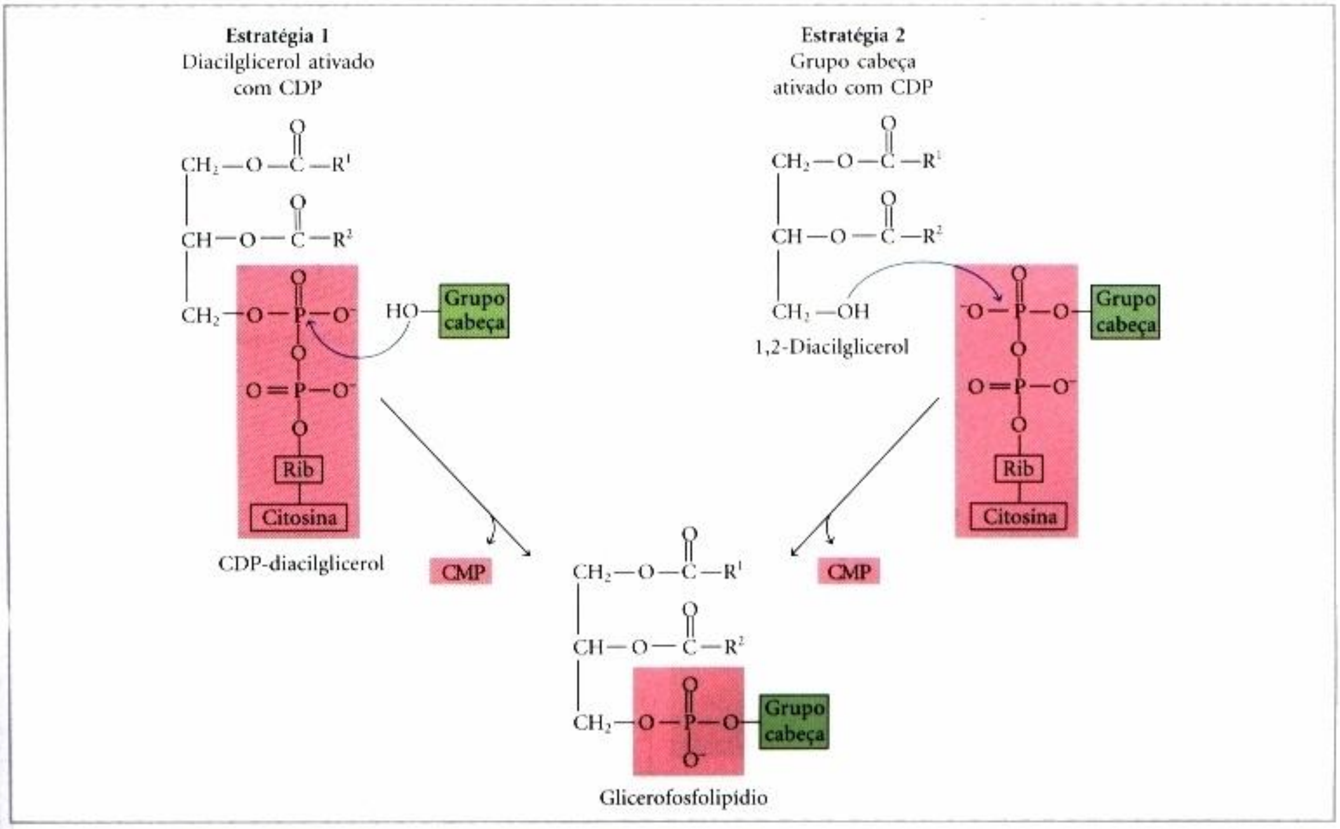

Estratégia 1
Diacilglicerol ativado com CDP
Grupo cabeça
Rib
Citosina
CDP-diacilglicerol
CMP
Estratégia 2
Grupo cabeça ativado com CDP
1,2-Diacilglicerol
Grupo cabeça
Rib
Citosina
CMP
Grupo cabeça
Glicerofosfolipídio

Figura 21-22 – Duas estratégias gerais de síntese da ligação fosfodiéster dos fosfolipídios. Nos dois casos, a CDP fornece o grupo fosfato da ligação fosfodiéster.

A síntese dos fosfolipídios na *E. coli* emprega o CDP-diacilglicerol

A primeira estratégia para ligação do grupo cabeça está ilustrada pela síntese da fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol na *E. coli*. O diacilglicerol é ativado pela condensação do ácido fosfatídico com CTP para formar CDP-diacilglicerol, com a eliminação de pirofosfato (Fig. 21-23). O deslocamento da CMP pelo ataque nucleofílico pelo grupo hidroxila da serina ou pela hidroxila em C-1 do glicerol-3-fosfato libera, respectivamente, **fosfatidilserina** ou fosfatidilglicerol-3-fosfato. O último é processado posteriormente pela clivagem do monoéster de fosfato (com liberação de P_i) para liberar **fosfatidilglicerol**.

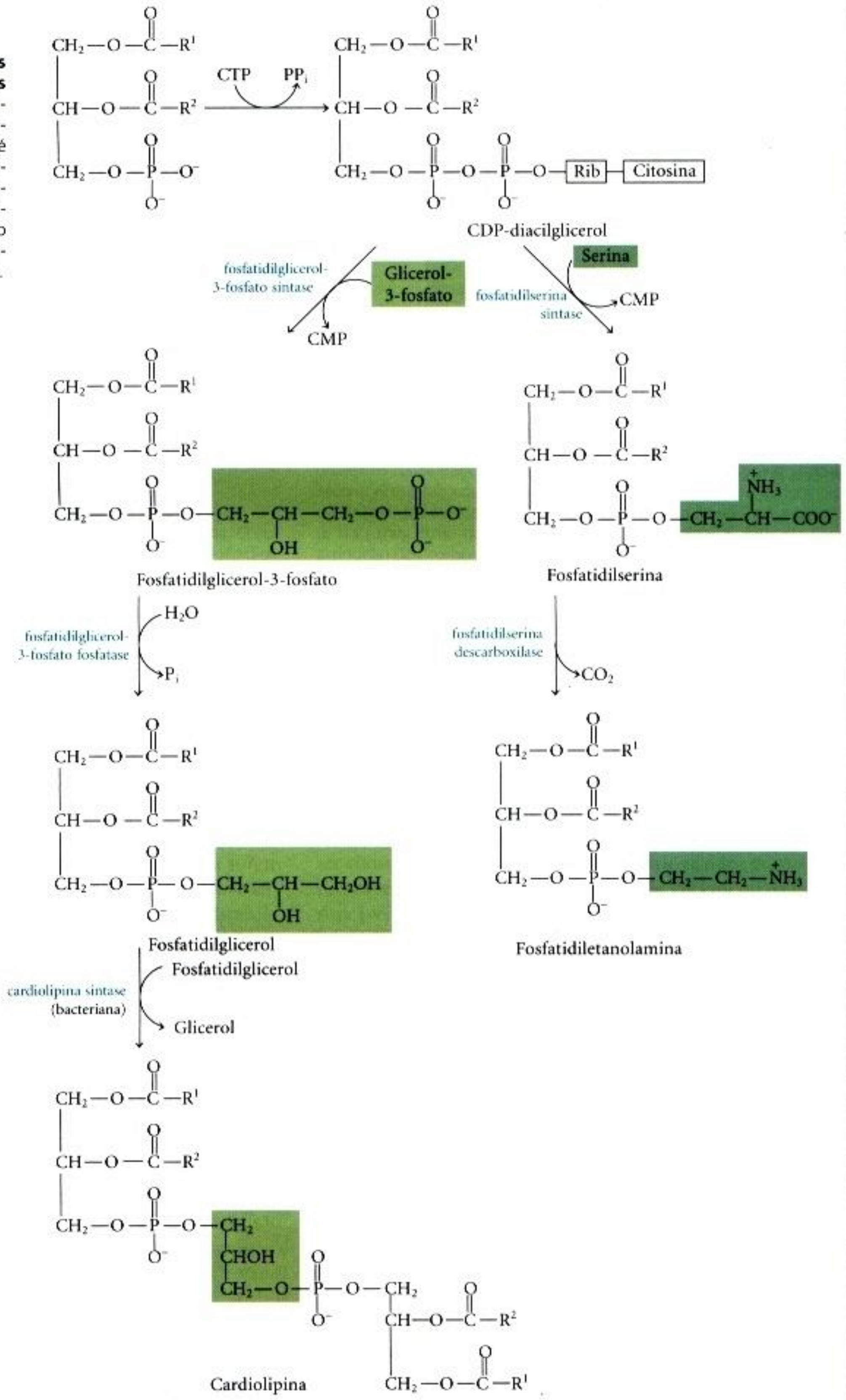

CTP
PP$_i$
CDP-diacilglicerol
fosfatidilglicerol-3-fosfato sintase
Glicerol-3-fosfato
CMP
Serina
fosfatidilserina sintase
CMP
Rib
Citosina
Fosfatidilglicerol-3-fosfato
Fosfatidilserina
fosfatidilglicerol-3-fosfato fosfatase
H$_2$O
P$_i$
fosfatidilserina descarboxilase
CO$_2$
Fosfatidilglicerol
Fosfatidiletanolamina
cardiolipina sintase (bacteriana)
Fosfatidilglicerol
Glicerol
Cardiolipina

Figura 21-23 – Origem dos grupos cabeça polares dos fosfolipídios na *E. coli*. Inicialmente, um grupo cabeça (serina ou glicerol-3-fosfato) é ligado por meio de um intermediário de CDP-diacilglicerol (estratégia 1). Para os fosfolipídios, que não a fosfatidilserina, o grupo cabeça é ainda mais modificado, como mostrado aqui.

A fosfatidilserina e o fosfatidilglicerol podem servir como precursores de outros lipídios de membrana nas bactérias (Fig. 21-23). A descarboxilação da fração serina na fosfatidilserina pela fosfatidilserina descarboxilase libera **fosfatidiletanolamina.** Na *E. coli,* a condensação de duas moléculas de fosfatidilglicerol, com a eliminação de uma molécula de glicerol, libera a **cardiolipina,** na qual dois diacilgliceróis estão reunidos por meio de um grupo cabeça.

Os eucariotos sintetizam fosfolipídios aniônicos a partir do CDP-diacilglicerol

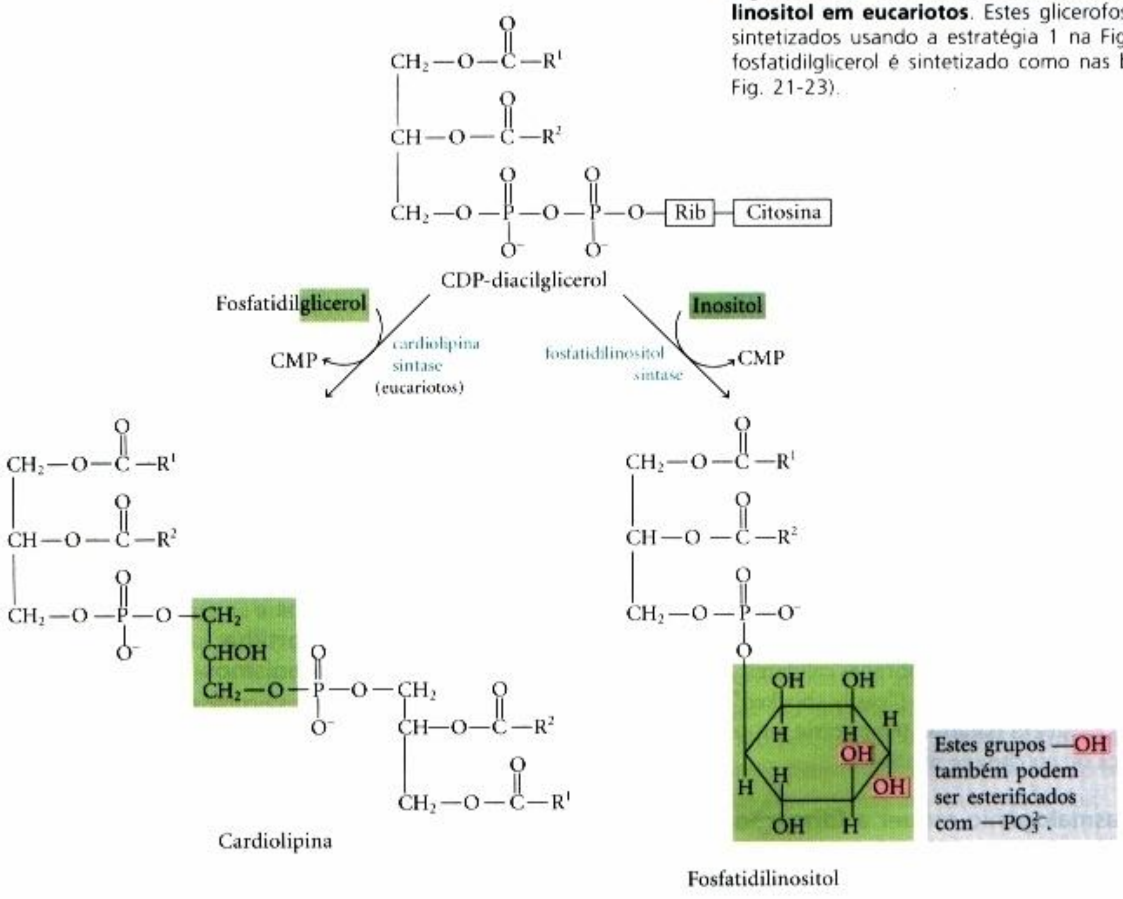
Nos eucariotos, fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilinositóis (todos fosfolipídios aniônicos; veja Fig. 11-8) são sintetizados pela mesma estratégia empregada para a síntese dos fosfolipídios nas bactérias. O fosfatidilglicerol é feito exatamente como nas bactérias. A síntese da cardiolipina nos eucariotos difere levemente: o fosfatidilglicerol se condensa com o CDP-diacilglicerol (Fig. 21-24), e não com outra molécula de fosfatidilglicerol como na *E. coli* (Fig. 21-23).

O fosfatidilinositol é sintetizado pela condensação de CDP-diacilglicerol com inositol (Fig. 21-24). **Fosfatidilinositol quinases** específicas convertem então o fosfatidilinositol nos seus derivados fosforilados (veja Fig. 11-15). Nos eucariotos, o fosfatidilinositol e seus produtos fosforilados na membrana plasmática desempenham um papel central na transdução de sinais, como descrito nas Figuras 13-8 e 13-17.

Nos eucariotos as vias de síntese de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina estão inter-relacionadas

Na levedura, como nas bactérias, a fosfatidilserina pode ser produzida pela condensação de CDP-diacilglicerol e serina; fosfatidiletanolamina pode ser sintetizada da fosfatidilserina na reação catalisada pela fosfatidilserina descarboxilase (Fig. 21-25). Nas células dos mamíferos, uma via alternativa para a fosfatidilserina é uma reação de troca de grupos cabeça, na qual a serina livre desloca a etanolamina. A fosfatidiletanolamina também pode ser convertida em **fosfatidilcolina** (lecitina) pela adição de três grupos metila ao seu grupo amino. Todas as três reações de metilação têm a *S*-adenosilmetionina como doadora do grupo metila (veja essas três reações na Fig. 18-17).

Nos mamíferos, a fosfatidilserina não é sintetizada a partir do CDP-diacilglicerol, mas sim derivada da fosfatidiletanolamina por meio de uma reação de troca de grupos cabeça (Fig. 21-25). Nos mamíferos, a síntese de todos os fosfolipídios que contêm nitrogênio ocorre pela estratégia 2 da Figura 21-22: fosforilação e ativação do grupo cabeça seguidas pela condensação com o diacilglicerol. Por exemplo, a colina é reutilizada (recuperada) por meio de um processo de fosforilação e, a seguir, convertida em CDP-colina por condensação com CTP. Um diacilglicerol desloca a CMP da CDP-colina, produzindo a fosfatidilcolina (Fig. 21-26). Uma via de recuperação análoga converte a etanolamina obtida na dieta em fosfatidiletanolamina. No fígado a fosfatidil-



Estes grupos —OH também podem ser esterificados com $—PO_3^{2-}$.

Figura 21-24 – A síntese de cardiolipina e fosfatidilinositol em eucariotos. Estes glicerofosfolipídios são sintetizados usando a estratégia 1 na Figura 21-22. O fosfatidilglicerol é sintetizado como nas bactérias (veja Fig. 21-23).

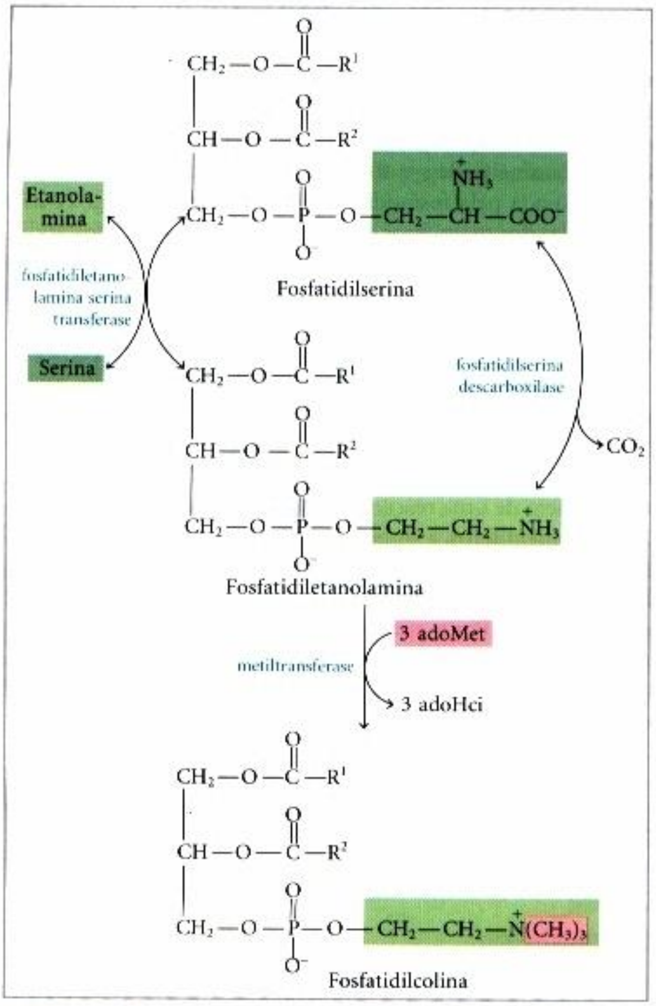

Etanolamina
Serina
fosfatidiletanolamina serina transferase
Fosfatidilserina
fosfatidilserina descarboxilase
CO2
Fosfatidiletanolamina
3 adoMet
metiltransferase
3 adoHci
Fosfatidilcolina

Figura 21-25 – A via de recuperação que vai da fosfatidilserina até a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina existente na levedura. A fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina são interconvertidas por uma reação reversível de troca de grupos cabeça. Nos mamíferos a fosfatidilserina é derivada da fosfatidiletanolamina por reversão dessa reação. adoMet representa *S*-adenosilmetionina (veja Fig. 18-17), adoHci representa *S*-adenosilomocisteína.

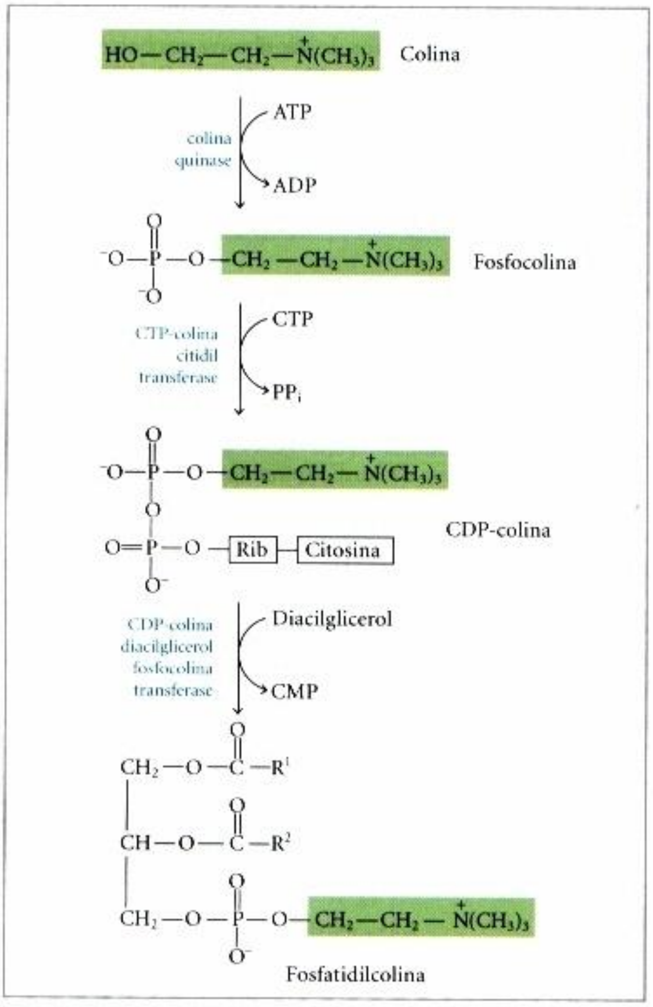

Colina
ATP
colina quinase
ADP
Fosfocolina
CTP
CTP-colina citidil transferase
PPi
Rib
Citosina
CDP-colina
Diacilglicerol
CDP-colina diacilglicerol fosfocolina transferase
CMP
Fosfatidilcolina

Figura 21-26 – A via de síntese da fosfatidilcolina a partir da colina nos mamíferos. A mesma estratégia (estratégia 2 na Figura 21-22) é empregada para a recuperação da etanolamina na síntese da fosfatidiletanolamina.

colina também é produzida pela metilação da fosfatidiletanolamina empregando a *S*-adenosilmetionina, como descrito anteriormente; mas em todos os outros tecidos, entretanto, a fosfatidilcolina é produzida apenas pela condensação de diacilglicerol e CDP-colina. As vias para fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina nos vários organismos estão resumidas na Figura 21-27.

Embora o papel dos lipídios nas funções das membranas celulares não seja inteiramente compreendido, podemos observar os efeitos dramáticos de alterações neles. Foram obtidas moscas das frutas com mutações no gene que codifica a enzima etanolamina quinase (análoga à colina quinase, Fig. 21-26); a falta dessa enzima elimina uma via de síntese da fosfatidilcolina, isso provoca redução no conteúdo de membranas celulares. As moscas com o genótipo "de choque fácil" ("easily shocked") carregam essa mutação e exibem paralisia temporária em seguida à estimulação elétrica ou ao choque mecânico.

A síntese do plasmalogênio requer a formação de uma ligação éter com um álcool graxo

A via biossintética dos lipídios com ligação éter na estrutura molecular, substâncias que incluem os **plasmalogênios** e o **fator ativador de plaquetas** (veja Fig. 11-9), envolve o deslocamento de um grupo acil-graxo esterificado por um álcool de cadeia longa para formar a ligação éter (Fig. 21-28). Segue-se a ligação do grupo cabeça por meio de mecanismos essencialmente iguais àqueles que ocorrem na síntese dos fosfolipídios formados por ligação éster. Finalmente, a dupla ligação característica dos plasmalogênios é introduzida pela ação de uma oxidase de função mista similar àquela responsável pela dessaturação de ácidos graxos (Fig. 21-14). O local de síntese da maioria dos plasmalogênios é o peroxissomo.

A síntese de esfingolipídios e glicerofosfolipídios compartilha precursores e alguns mecanismos

A biossíntese dos esfingolipídios ocorre em quatro estágios: (1) síntese de uma amina com 18 carbonos, a **esfinganina**, a partir do palmitoil-CoA e da serina; (2) ligação de um ácido graxo por meio de ligação amida para formar ***N*-acilesfinganina**; (3) dessaturação da porção esfinganina para formar ***N*-acilesfinganina**; e (4) ligação de um grupo cabeça para produzir um esfingolipídio, tal como um **cerebrosídio** ou **esfingomielina** (Fig. 21-29). Essa via compartilha várias características com as vias de síntese dos glicerofosfolipídios. Assim, o NADPH fornece a for-

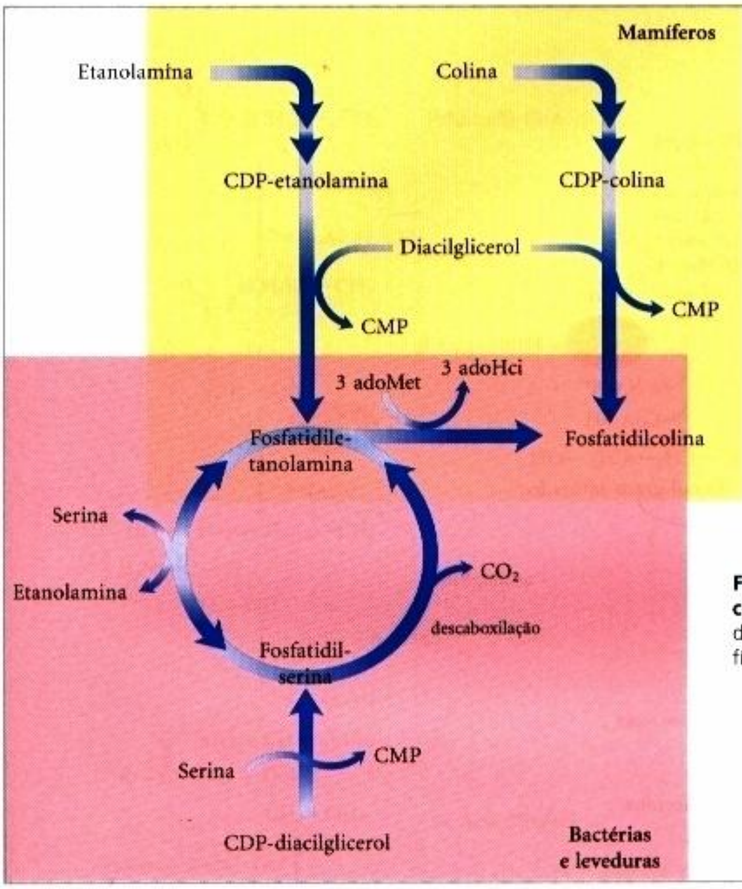


Figura 21-27 – Resumo das vias de síntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Nos mamíferos a conversão da fosfatidiletanolamina em fosfatidilcolina ocorre apenas no fígado.

ça redutora e os ácidos graxos entram na via na forma dos seus derivados de CoA ativados. Na formação dos cerebrosídeos, os açúcares entram como seus derivados de nucleotídeo ativados. A ligação dos grupos cabeça durante a síntese de esfingolipídios tem vários aspectos originais. A fosfatidilcolina, antes que a CDP-colina, é que funciona como doadora de fosfocolina na síntese de esfingomielina (Fig. 21-29). Nos glicolipídios, os cerebrosídeos e os **gangliosídeos** (veja Fig. 11-10), o grupo cabeça é um açúcar ligado diretamente a C-1 hidroxila da esfingosina em ligação glicosídica, e não por meio de uma ligação fosfodiéster; o doador de açúcar é um derivado UDP-açúcar (UDP-glicose ou UDP-galactose).

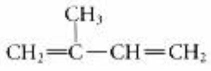
Lipídios polares são dirigidos para membranas celulares específicas

Depois de serem sintetizadas no retículo endoplasmático liso, os lipídios polares, incluindo glicerofosfolipídios, esfingolipídios e glicolipídios, são inseridos em diferentes membranas celulares e em diferentes proporções por meio de mecanismos que ainda não são inteiramente conhecidos. Os lipídios de membranas são insolúveis na água e, portanto, eles não podem simplesmente difundir de seus lugares de síntese (o retículo endoplasmático) para seus pontos de inserção. Em vez disso, eles são liberados em vesículas de membranas que brotam do complexo de Golgi e, então, movem-se para as membranas a que são destinados e com elas se fundem (veja Figs. 2-9 e 12-20). Proteínas citosólicas também ligam esteróis e fosfolipídios, transportando-os entre as membranas celulares e entre as faces das bicamadas lipídicas. Esses mecanismos contribuem para estabelecer a composição lipídica característica das membranas das organelas (veja Fig. 12-2).

Biossíntese do Colesterol, dos Esteróides e dos Isoprenóides

Sem dúvida alguma, o colesterol é o lipídio da natureza que mais publicações recebeu, e isso é devido à forte correlação existente na espécie humana entre os altos níveis de colesterol no sangue e a incidência de doenças do sistema cardiovascular. Menos noticiado é o papel crítico do colesterol na estrutura de muitas membranas e como precursor dos hormônios esteróides e dos ácidos biliares. O colesterol é uma molécula imprescindível em muitos animais, inclusive no homem. Ele não é necessário na dieta dos mamíferos, porque o fígado deles pode sintetizá-lo a partir de precursores mais simples.

Embora a estrutura molecular desse composto de 27 átomos de carbono sugira uma biossíntese de grande complexidade, todos esses átomos são fornecidos por um único precursor — o acetato (Fig. 21-30). O estudo dessa via biossintética levou à compreensão do transporte entre os órgãos do colesterol e de outros lipídios, do processo pelo qual o colesterol penetra nas células (endocitose mediada por receptores), dos meios pelos quais a produção intracelular de colesterol é influenciada pelo colesterol na alimentação e de como a falha na regulação da produção do colesterol afeta a nossa saúde. As unidades de **isopreno**, que são intermediários-chave na via do acetato até o colesterol, são precursoras de muitos outros lipídios naturais e os mecanismos pelos quais essas unidades de isoprenos são polimerizadas são similares em todas essas vias.



$$CH_2{=}\overset{\overset{\displaystyle CH_3}{|}}{C}{-}CH{=}CH_2$$

Isopreno

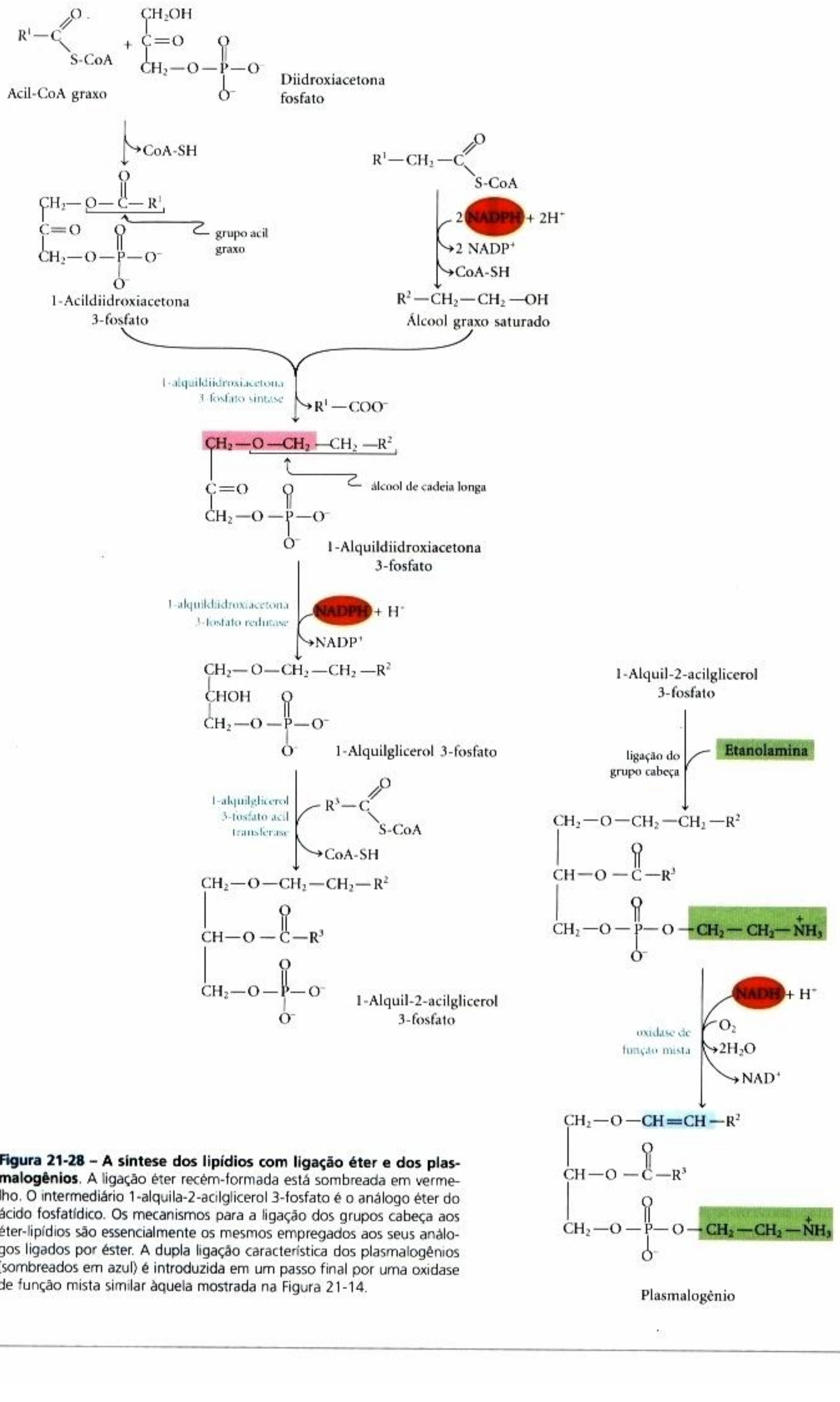

Acil-CoA graxo
Diidroxiacetona fosfato
CoA-SH
grupo acil graxo
1-Acildiidroxiacetona 3-fosfato
2 NADPH + 2H⁺
2 NADP⁺
CoA-SH
Álcool graxo saturado
1-alquildiidroxiacetona 3-fosfato sintase
R¹—COO⁻
álcool de cadeia longa
1-Alquildiidroxiacetona 3-fosfato
1-alquildiidroxiacetona 3-fosfato redutase
NADPH + H⁺
NADP⁺
1-Alquilglicerol 3-fosfato
1-alquilglicerol 3-fosfato acil transferase
CoA-SH
1-Alquil-2-acilglicerol 3-fosfato
1-Alquil-2-acilglicerol 3-fosfato
ligação do grupo cabeça
Etanolamina
oxidase de função mista
NADH + H⁺
O₂
2H₂O
NAD⁺
Plasmalogênio

Figura 21-28 – A síntese dos lipídios com ligação éter e dos plasmalogênios. A ligação éter recém-formada está sombreada em vermelho. O intermediário 1-alquila-2-acilglicerol 3-fosfato é o análogo éter do ácido fosfatídico. Os mecanismos para a ligação dos grupos cabeça aos éter-lipídios são essencialmente os mesmos empregados aos seus análogos ligados por éster. A dupla ligação característica dos plasmalogênios (sombreados em azul) é introduzida em um passo final por uma oxidase de função mista similar àquela mostrada na Figura 21-14.

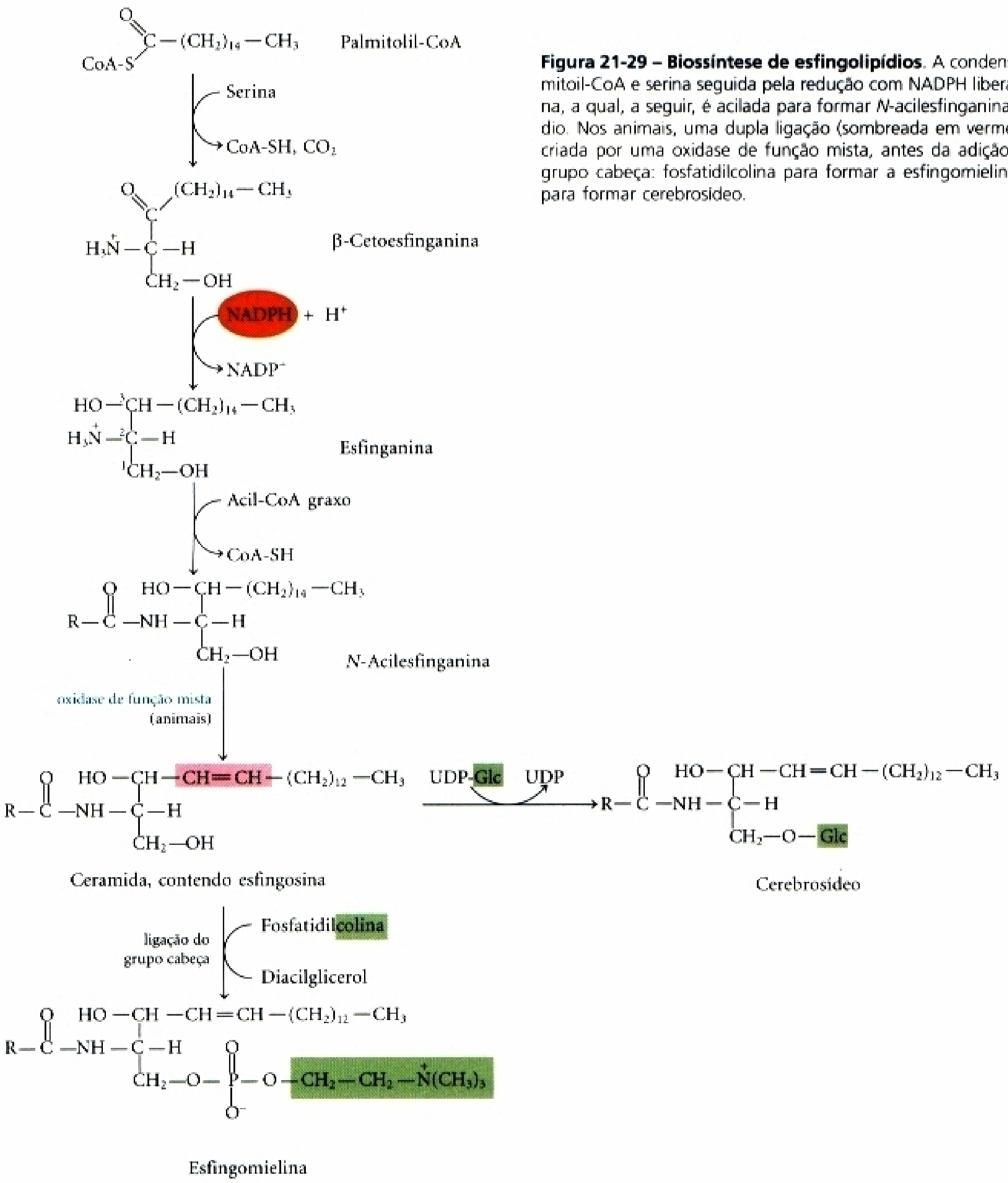

Palmitoil-CoA
Serina
CoA-SH, CO₂
β-Cetoesfinganina
NADPH + H⁺
NADP⁺
Esfinganina
Acil-CoA graxo
CoA-SH
N-Acilesfinganina
oxidase de função mista (animais)
UDP-Glc
UDP
Ceramida, contendo esfingosina
Cerebrosídeo
ligação do grupo cabeça
Fosfatidilcolina
Diacilglicerol
Esfingomielina

Figura 21-29 – Biossíntese de esfingolipídios. A condensação de palmitoil-CoA e serina seguida pela redução com NADPH libera a esfinganina, a qual, a seguir, é acilada para formar *N*-acilesfinganina, um ceramídio. Nos animais, uma dupla ligação (sombreada em vermelho) é então criada por uma oxidase de função mista, antes da adição final de um grupo cabeça: fosfatidilcolina para formar a esfingomielina, ou glicose para formar cerebrosídeo.

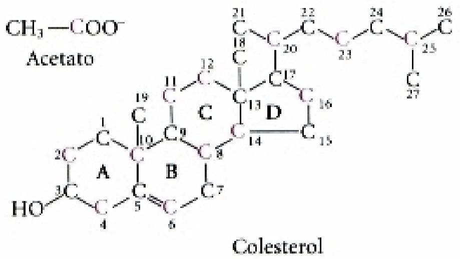

Acetato
Colesterol
A
B
C
D

Figura 21-30 – A origem dos átomos de carbono do colesterol. Esta origem pode ser deduzida dos experimentos de marcação com isótopos radioativos dos carbonos do grupo metila (preto) e do grupo carboxila (vermelho) do acetato. Os anéis individuais do sistema de anéis fundidos estão designados de A até D.

Iniciaremos com uma descrição dos principais passos na biossíntese do colesterol a partir do acetato, então discutiremos o transporte do colesterol no sangue, sua captação pelas células e a regulação da síntese do colesterol em indivíduos normais e naqueles com defeitos na captação e em seu transporte. Vamos considerar também outros componentes celulares derivados do colesterol, como os ácidos biliares e os hormônios esteróides. Finalmente, para ilustrar a extraordinária versatilidade das condensações isoprenóides nos processos biossintéticos, descreveremos as vias que levam a alguns dos muitos compostos derivados das unidades de isopreno e que compartilham os primeiros passos da biossíntese do colesterol.

A biossíntese do colesterol a partir do acetil-CoA tem quatro estágios

A molécula do colesterol, como aquelas dos ácidos graxos de cadeia longa, é construída com moléculas de acetil-CoA, mas o esquema operacional de montagem é muito diferente nos dois casos. Nos primeiros experimentos a respeito desse assunto, os animais foram alimentados com acetato marcado com ^{14}C, quer no carbono metila, quer no carbono carboxila. O padrão de marcação no colesterol isolado dos dois grupos de animais (Fig. 21-30) forneceu o esquema de operação dos passos enzimáticos que ocorrem na biossíntese do colesterol.

O processo ocorre em quatro estágios (Fig. 21-31). No estágio ① as três unidades de acetato se condensam para formar um intermediário com seis carbonos, o mevalonato. O estágio ② envolve a conversão do mevalonato em unidades de isopreno ativado e o estágio ③ consiste na polimerização das seis unidades com cinco átomos de carbono do isopreno para formar a estrutura linear do esqualeno, com 30 átomos de carbono. Finalmente, no estágio ④, a ciclização do esqualeno forma os quatro anéis do núcleo esteróide e uma ulterior série de mudanças (oxidações, remoção ou migração de grupos metila) levam ao produto final, o colesterol.

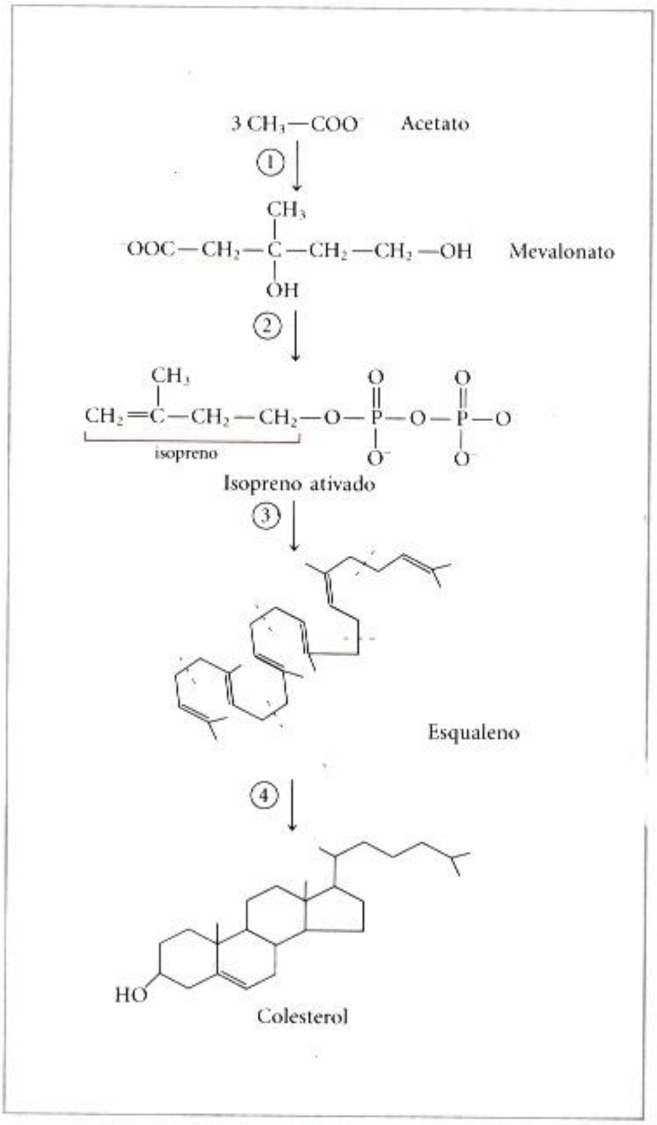


Figura 21-31 – Um resumo da biossíntese do colesterol. Os quatro estágios estão discutidos no texto. As unidades de isopreno no esqualeno são denotadas pelas linhas vermelhas tracejadas.

Estágio ① Síntese do mevalonato a partir do acetato. O primeiro estágio na biossíntese do colesterol leva ao intermediário **mevalonato** (Fig. 21-32). Duas moléculas de acetil-CoA condensam-se, formando acetoacetil-CoA, este se condensa com uma terceira molécula de acetil-CoA para liberar um composto com seis átomos de carbono, o **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)**. Essas duas primeiras reações, catalisadas pela **tiolase** e pela **HMG-CoA sintase**, respectivamente, são reversíveis e sua ocorrência não implica o comprometimento definitivo da célula com a síntese do colesterol ou outros compostos isoprenóides. A HMG-CoA sintase citosólica dessa via é diferente da isozima que catalisa a síntese do HMG-CoA durante a formação dos corpos cetônicos (veja Fig. 17-16).

Entretanto, a terceira reação representa esse comprometimento e é o passo decisivo, sem retorno: a redução do HMG-CoA em mevalonato, para o qual duas moléculas de NADPH doam cada uma delas dois elétrons. A **HMG-CoA redutase**, uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso é, como veremos, o principal ponto de regulação na via para o colesterol.

Estágio ② Conversão do mevalonato em duas unidades de isopreno ativado. No estágio seguinte da síntese do colesterol, três grupos fosfatos são transferidos de três moléculas do ATP para o mevalonato (Fig. 21-33). O fosfato ligado ao grupo hidroxila no C-3 do mevalonato no intermediário 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato é um bom grupo abandonador; no próximo passo esse fosfato e o grupo carboxila próximo saem, deixando uma dupla ligação no produto de cinco átomos de carbono, o **Δ^3-isopentenil pirofosfato**. Este é o primeiro de dois isoprenos ativados centrais na formação do colesterol. A isomerização do Δ^3-isopentenil pirofosfato libera o segundo isopreno ativado, o **dimetilalil pirofosfato** (Fig. 21-33). A síntese do isopentenil pirofosfato no citoplasma das células vegetais segue a via descrita aqui. Entretanto, em muitas bactérias e nos cloroplastos das células vegetais, é empregada uma via independente para o mevalonato. Essa via alternativa não existe nos animais e, por isso, representa um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos antibióticos.

Estágio ③ Condensação de seis unidades de isopreno ativadas para formar o esqualeno. O isopentenil pirofosfato e o dimetilalil pirofosfato sofrem agora uma condensação "cabeça com cauda" na qual um grupo pirofosfato é deslocado e é formada uma cadeia de 10 carbonos, o **geranil pirofosfato** (Fig. 21-34) (a "cabeça" é a extremidade na qual o pirofosfato está ligado). O geranil pirofosfato sofre outra condensação "cabeça com cauda" com o isopentenil pirofosfato, li-

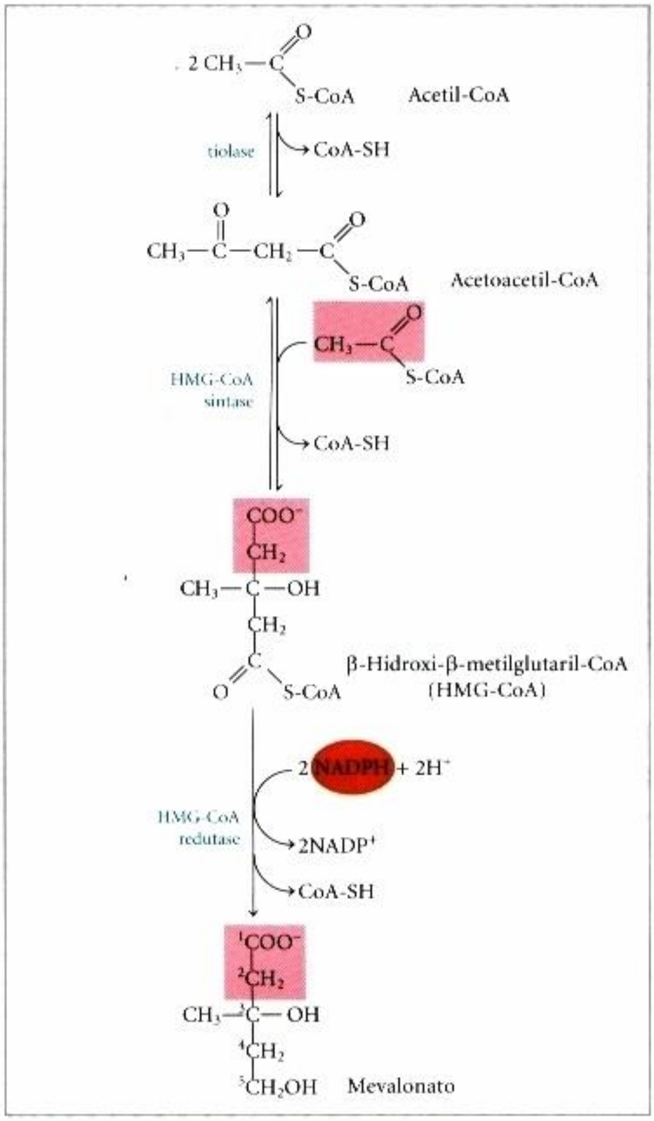

Acetil-CoA
tiolase
CoA-SH
Acetoacetil-CoA
HMG-CoA sintase
S-CoA
CoA-SH
β-Hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)
HMG-CoA redutase
2NADPH + 2H⁺
2NADP⁺
CoA-SH
Mevalonato

Figura 21-32 – Formação do mevalonato a partir do acetil-CoA. A origem de C-1 e C-2 do mevalonato a partir do acetil-CoA está mostrada em vermelho.

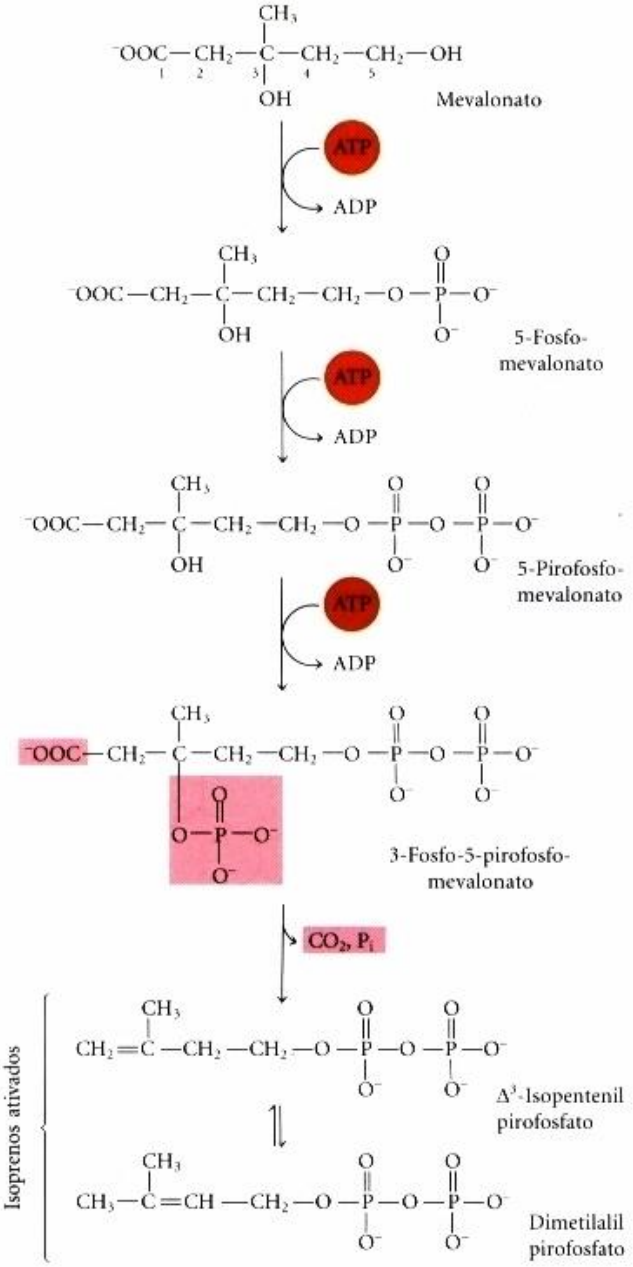

Mevalonato
ATP
ADP
5-Fosfo-mevalonato
ATP
ADP
5-Pirofosfo-mevalonato
ATP
ADP
3-Fosfo-5-pirofosfo-mevalonato
CO₂, Pᵢ
Isoprenos ativados
Δ³-Isopentenil pirofosfato
Dimetilalil pirofosfato

Figura 21-33 – Conversão do mevalonato em unidades ativadas de isopreno. Seis destas unidades combinar-se-ão para formar o esqualeno. Os grupos abandonadores do 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato estão sombreados em vermelho.

berando o intermediário de 15 carbonos **farnesil pirofosfato**. Finalmente, duas moléculas de farnesil pirofosfato unem-se "cabeça com cabeça", com a eliminação dos dois grupos pirofosfato, e formam o **esqualeno** (Fig. 21-34). Os nomes comuns desses compostos derivam das fontes das quais eles foram isolados pela primeira vez. O geraniol, um componente do óleo de rosas, tem o cheiro de gerânios, e o farnesol é uma substância aromática encontrada nas flores de uma árvore, a acácia Farnese. Muitos aromas naturais de origem vegetal são sintetizados a partir de unidades de isopreno. O esqualeno, isolado primeiro do fígado de tubarões (gênero *Squalus*), tem 30 carbonos, 24 na cadeia principal e seis na forma de ramificações de grupos metila.

Estágio ④ Conversão do esqualeno no núcleo esteróide com quatro anéis. Quando a molécula de esqualeno é representada como na Figura 21-35, a relação de sua estrutura linear para a estrutura cíclica dos esteróides é aparente. Todos os esteróis têm quatro anéis fundidos (o núcleo esteróide) e todos são álcoois, com um grupo hidroxila em C-3; daí o nome "esterol". A ação da **esqualeno monoxigenase** acrescenta um átomo de oxigênio do O_2 na extremidade da cadeia do esqualeno, formando um epóxido. Essa enzima é outra oxidase de função mista (Adendo 21-1); o NADPH reduz o outro átomo de oxigênio do O_2 até H_2O. As duplas ligações do produto, **esqualeno-2,3-epóxido**, são posicionadas de tal forma que uma notável reação concertada pode converter o epóxido de esqualeno linear em uma estrutura cíclica. Nas células animais, essa ciclização resulta na formação de **lanoesterol**, que contém os quatro anéis característicos do núcleo esteróide. Finalmente, o lanoesterol é convertido em colesterol em uma série de aproximadamente 20 reações, que incluem a migração de alguns grupos metila e a remoção de outros. A elucidação dessa via biossintética extraordinária, uma das mais complexas conhecidas, foi conseguida no final da década de 1950 por Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth e George Popják.

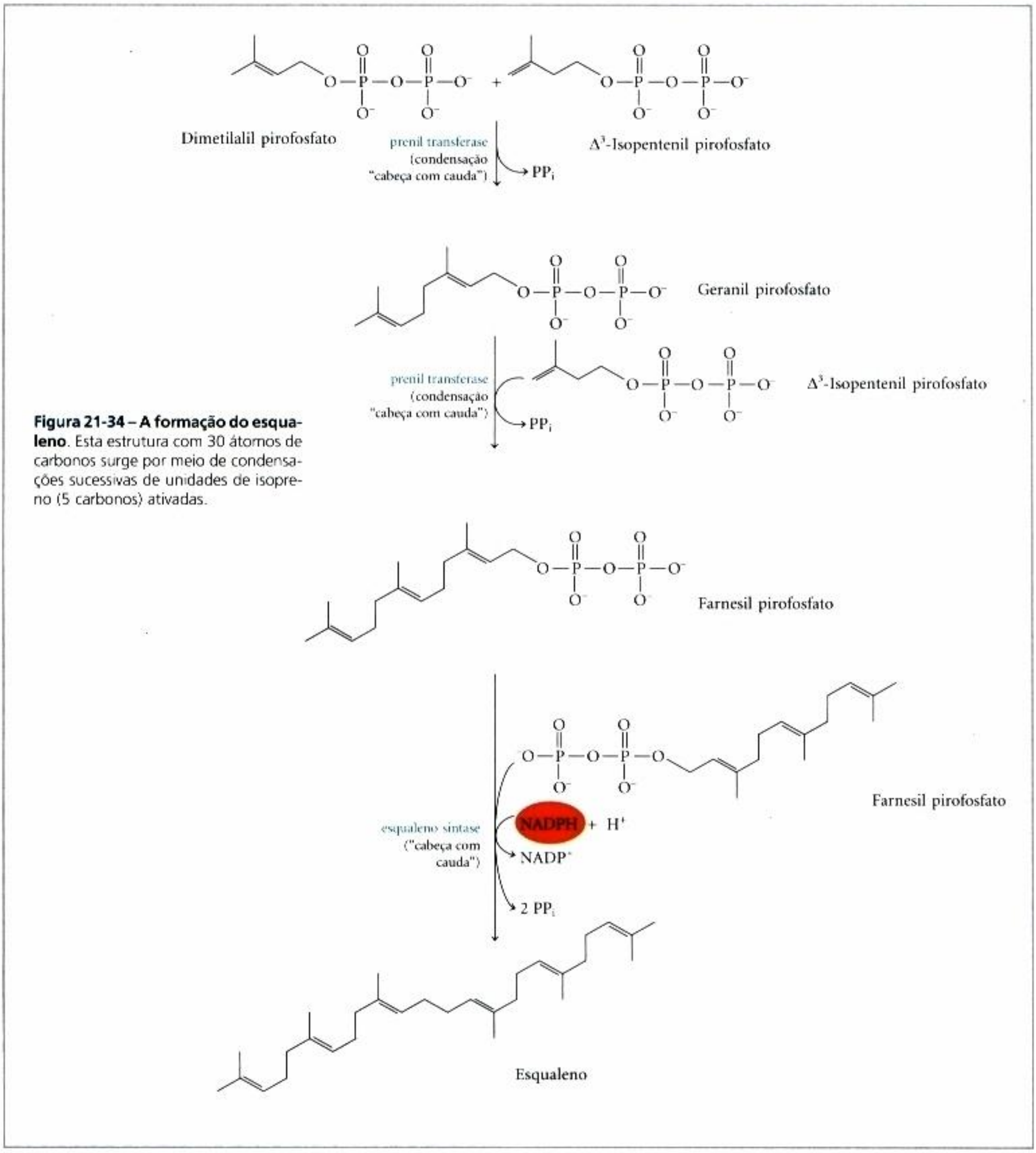

Dimetilalil pirofosfato
Δ^3-Isopentenil pirofosfato
prenil transferase
(condensação "cabeça com cauda")
PP$_i$
Geranil pirofosfato
Δ^3-Isopentenil pirofosfato
prenil transferase
(condensação "cabeça com cauda")
PP$_i$
Farnesil pirofosfato
Farnesil pirofosfato
esqualeno sintase
("cabeça com cauda")
NADPH + H$^+$
NADP$^+$
2 PP$_i$
Esqualeno

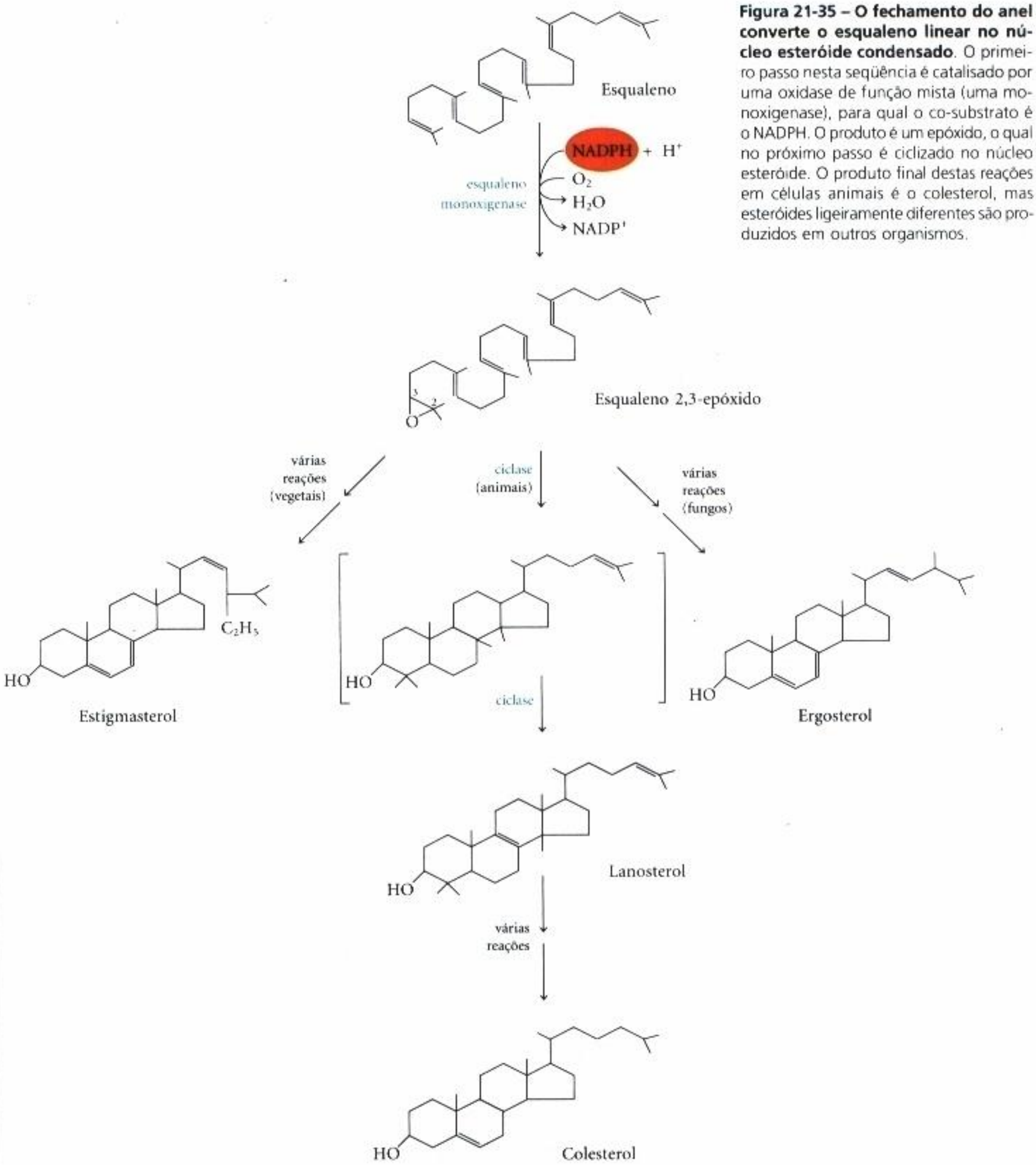
Figura 21-34 – A formação do esqualeno. Esta estrutura com 30 átomos de carbonos surge por meio de condensações sucessivas de unidades de isopreno (5 carbonos) ativadas.

O colesterol é o esterol característico das células animais, mas os vegetais, fungos e protistas, em vez do colesterol, sintetizam outros esteróis intimamente relacionados, empregando a mesma via sintética até o passo do esqualeno-2,3-epóxido. Nesse ponto as vias sintéticas divergem levemente e outros esteróides são produzidos: estigmasterol em muitos vegetais e ergosterol nos fungos, por exemplo (Fig. 21-35).

O colesterol tem muitos destinos

Nos vertebrados a maior parte da síntese do colesterol ocorre no fígado. Uma pequena fração do colesterol sintetizado ali é incorporada nas membranas dos hepatócitos, mas a maior parte dele é exportada em uma de três formas: colesterol biliar, ácidos biliares e ésteres do colesterol. Os **ácidos biliares** e seus sais são derivados do colesterol relativamente hidrofílicos, eles são sintetizados no fígado e ajudam na digestão dos lipídios (veja Fig. 17-1). Os **ésteres do colesterol** são formados no fígado por meio da ação da enzima **acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT)**. Essa enzima catalisa a transferência de um ácido graxo da coenzima A para o grupo hidroxila do colesterol (Fig. 21-36), convertendo o colesterol em uma substância ainda mais hidrofóbica. Os ésteres do colesterol são armazenados no fígado ou transportados inseridos em partículas lipoprotéicas para outros tecidos que empregam colesterol.

Figura 21-35 – O fechamento do anel converte o esqualeno linear no núcleo esteróide condensado. O primeiro passo nesta seqüência é catalisado por uma oxidase de função mista (uma monoxigenase), para qual o co-substrato é o NADPH. O produto é um epóxido, o qual no próximo passo é ciclizado no núcleo esteróide. O produto final destas reações em células animais é o colesterol, mas esteróides ligeiramente diferentes são produzidos em outros organismos.


Esqualeno
NADPH + H⁺
esqualeno monoxigenase
O₂
H₂O
NADP⁺
3
2
O
Esqualeno 2,3-epóxido
várias reações (vegetais)
ciclase (animais)
várias reações (fungos)
C₂H₅
HO
Estigmasterol
HO
ciclase
HO
Ergosterol
HO
Lanosterol
várias reações
HO
Colesterol

Konrad Bloch

Feodor Lynen
(1911-1979)

John Cornforth

George Popják

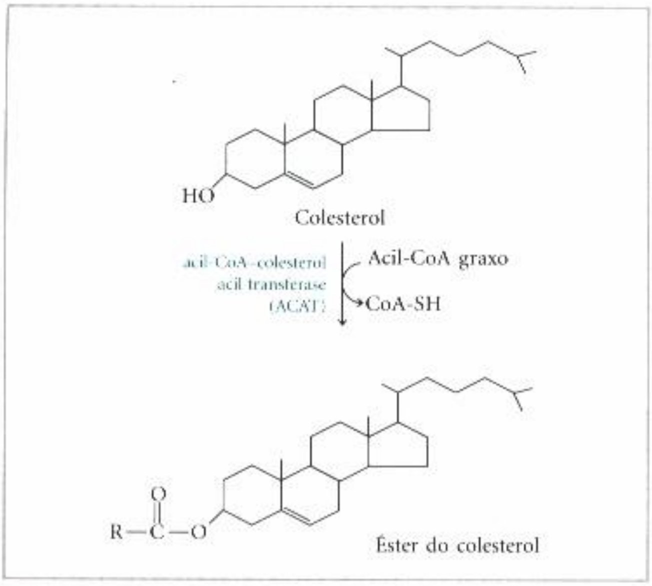


Figura 21-36 – A síntese dos ésteres do colesterol. A esterificação converte o colesterol em uma substância ainda mais hidrofóbica para o armazenamento e para o transporte.

Todos os tecidos animais em crescimento necessitam de colesterol para a síntese de membranas; alguns órgãos (glândula adrenal e gônadas, por exemplo) usam o colesterol como um precursor para a produção dos hormônios esteróides (discutidos adiante). O colesterol é também um precursor da vitamina D (veja Fig. 11-18a).

O colesterol e outros lipídios são transportados pelas lipoproteínas do plasma

O colesterol e os ésteres do colesterol, como os triacilgliceróis e fosfolipídios, são essencialmente insolúveis em água. Esses lipídios precisam, entretanto, ser transportados do tecido de origem para os tecidos nos quais eles serão armazenados ou consumidos. Eles são transportados de um para outro tecido pelo plasma sangüíneo na forma de **lipoproteínas plasmáticas**, que são complexos moleculares de proteínas transportadoras específicas chamadas de **apolipoproteínas** com combinações variadas de fosfolipídios, colesterol, ésteres do colesterol e triacilgliceróis.

As apolipoproteínas ("apo" designa a proteína na sua forma livre de lipídios) se unem aos lipídios para formar várias classes de partículas lipoprotéicas, estas são complexos esféricos com os lipídios hidrofóbicos no centro e as cadeias laterais hidrofílicas dos aminoácidos das proteínas na superfície (Fig. 21-37a). Diferentes combinações de lipídios e proteínas produzem partículas com densidades diferentes, variando desde quilomícrons até lipoproteínas de densidade muito alta (HDL). Essas lipoproteínas podem ser separadas entre si por ultracentrifugação (Tabela 21-2) e visualizadas com o emprego da microscopia eletrônica (Fig. 21-37b).

Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinada por seu lugar de síntese, composição lipídica e conteúdo de apolipoproteína. Pelo menos nove apolipoproteínas diferentes são encontradas entre as lipoproteínas do plasma humano (Tabela 21-3); elas podem ser distinguidas por seu tamanho, suas reações com anticorpos específicos e sua distribuição característica nas classes de lipoproteínas. Essas partes protéicas agem como sinalizadoras, tanto dirigindo as lipoproteínas para tecidos específicos, como ativando enzimas que agem sobre elas.

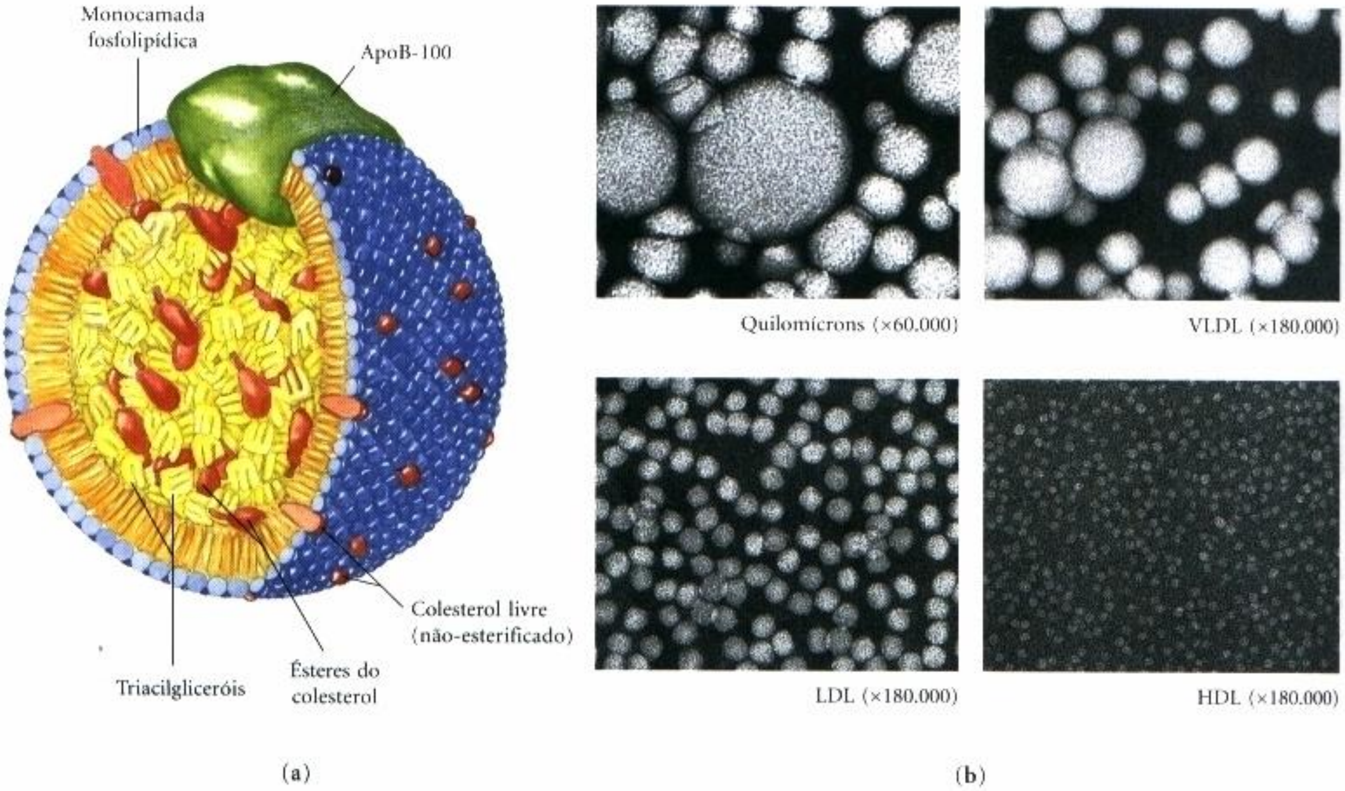


Figura 21-37 – (**a**) Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL). A apolipoproteína B-100 (apoB-100) é uma das maiores cadeias polipeptídicas singulares conhecidas, ela possui 4.636 resíduos de aminoácidos (M_r 513.000). (**b**) Quatro classes de lipoproteínas visualizadas ao microscópio eletrônico depois de sofrerem coloração negativa. De cima para baixo: quilomícrons (50-200nm de diâmetro); VLDL (28-70nm); LDL (20-25nm); e HDL (8-11nm). Para as propriedades das lipoproteínas veja a Tabela 21-2.

Tabela 21-2 – Classes principais de lipoproteínas humanas: algumas propriedades

Lipoproteína	Densidade (g/mL)	Composição (% em peso)				
		Proteína	Fosfolipídios	Colesterol livre	Ésteres do colesterol	Triacilgliceróis
Quilomícrons	< 1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	15	4

Fonte: Modificado de Kritchevsky D. (1986) Atherosclerosis and nutrition. *Nutr. Int.* **2**, 290-297.

Tabela 21-3 – Apolipoproteínas das lipoproteínas plasmáticas humanas

Apolipoproteína	Peso molecular	Associação lipoprotéica	Função (se conhecida)
ApoA-I	28.331	HDL	Ativa LCAT, interage com o transportador ABC
ApoA-II	17.380	HDL	
ApoA-IV	44.000	Quilomícrons, HDL	
ApoB-48	240.000	Quilomícrons	
ApoB-100	513.000	VLDL, LDL	Liga-se ao receptor de LDL
ApoC-I	7.000	VLDL, HDL	
ApoC-II	8.837	Quilomícrons, VLDL, HDL	Ativa a lipase lipoprotéica
ApoC-III	8.751	Quilomícrons, VLDL, HDL	Inibe a lipase lipoprotéica
ApoD	32.500	HDL	
ApoE	34.145	Quilomícrons, VLDL, HDL	Inicia a retirada dos remanescentes dos quilomícrons e VLDL

Fonte: Modificado de Vance DE & Vance JE (eds). (1985) *Biochemistry of Lipids and Membranes*. The Benjamim/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.

Os **quilomícrons** já foram discutidos em conexão com o movimento dos triacilgliceróis da dieta desde o intestino até os outros tecidos. Eles são as maiores lipoproteínas e também as menos densas, contendo uma alta proporção de triacilgliceróis (veja Fig. 17-2). Os quilomícrons são sintetizados no retículo endoplasmático das células epiteliais que recobrem a superfície interna do intestino delgado e, então, são transportados através do sistema linfático e entram na corrente sangüínea através da veia subclávia. As apolipoproteínas dos quilomícrons incluem a apoB-48 (exclusiva dessa classe de lipoproteínas), a apoE e a apoC-II (Tabela 21-3). A apoC-II ativa a lipase lipoprotéica nos capilares dos tecidos adiposo, cardíaco, musculoesquelético e glândula mamária em lactação, permitindo a liberação de ácidos graxos livres para esses tecidos. Dessa forma, os quilomícrons transportam os ácidos graxos obtidos na dieta para os tecidos em que serão consumidos ou armazenados como combustíveis (Fig. 21-38). Os remanescentes dos quilomícrons, privados da maior parte dos seus triacilgliceróis, mas ainda contendo colesterol, apoE e apoB-48, movem-se através da corrente sangüínea até o fígado. Existem, no fígado, receptores que se ligam à apoE nos remanescentes dos quilomícrons e promovem sua absorção por endocitose. No fígado, eles liberam o colesterol e são degradados nos lisossomos.

Quando a dieta contém mais ácidos graxos que a quantidade imediatamente necessária como combustível, estes são convertidos em triacilgliceróis no fígado e unidos com apolipoproteínas específicas para formar **lipoproteínas de muito baixa densidade**, as **VLDL** ("*v*ery-*l*ow-*d*ensity *l*ipoprotein"). Os carboidratos que chegam em excesso pela dieta também podem ser convertidos em triacilgliceróis no fígado e exportados como VLDL (Fig. 21-38a). Em adição aos triacilgliceróis, as VLDL contêm algum colesterol e ésteres do colesterol, bem como apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE (Tabela 21-3). Essas lipoproteínas são transportadas do fígado para os músculos e para o tecido adiposo, onde a ativação da lipase lipoprotéica pela apoC-II provoca a liberação de ácidos graxos livres dos triacilgliceróis das VLDL. Os adipócitos captam esses ácidos graxos, ressintetizam os triacilgliceróis a partir deles e armazenam os produtos em gotículas lipídicas intracelulares; já os miócitos empregam esses ácidos graxos na produção de energia por oxidação. A maior parte dos remanescentes de VLDL é retirada da circulação pelos hepatócitos. Como para os quilomícrons, essa captação depende da mediação de receptores e da presença de apoE nos remanescentes de VLDL (Adendo 21-3).

A perda dos triacilgliceróis converte algumas VLDL em remanescentes de VLDL (também chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária, IDL — "*i*ntermediate *d*ensity *l*ipoproteins") e com a saída de mais triacilgliceróis em **lipoproteínas de densidade baixa, LDL** ("*l*ow-*d*ensity *l*ipoprotein") (Tabela 21-2). Muito ricas em colesterol e em ésteres do colesterol e contendo apoB-100 como sua principal apolipoproteína, as LDL transportam o colesterol para os tecidos periféricos (outros tecidos que não o fígado), que possuem receptores de superfície específicos que reconhecem a apoB-100. Esses receptores intermedeiam a captação do colesterol e dos ésteres de colesterol em um processo descrito adiante.

O quarto tipo principal das lipoproteínas, a **lipoproteína de alta densidade, HDL** ("*h*igh-*d*ensity *l*ipoprotein"), é sintetizada no fígado e no intestino delgado como partículas pequenas ricas em proteína e contendo relativamente pouco colesterol e nenhum éster de colesterol (Fig. 21-38). As HDL contêm apoA-1, apoC-I e apoC-II, entre outras apolipoproteínas (Tabela 21-3), bem como a enzima **lecitina-colesterol aciltransferase** (LCAT), que catalisa a formação de ésteres do colesterol a partir da lecitina (fosfatidilcolina) e colesterol (Fig. 21-39). A LCAT existente na superfície de HDL recém-sintetizada converte essa fosfatidilcolina e colesterol dos remanescentes dos quilomícrons e VLDL em ésteres do colesterol, os quais entram no interior da HDL nascente, convertendo-a de um disco chato em uma esfera — uma HDL madura. Essas lipoproteínas ricas em colesterol voltam agora ao fígado, onde o colesterol é descarregado e parte dele convertida em sais biliares.

As HDL podem ser captadas pelo fígado por meio da endocitose mediada por receptores, mas ao menos algum colesterol nelas presente é liberado para outros tecidos por um mecanismo diferente. As HDL podem ligar-se a receptores de membrana para proteínas plasmáticas chamados SR-BI presentes no tecido hepático e naqueles produtores de esteróides como a glândula adrenal. Esses receptores não fazem a mediação da endocitose mas uma transferência parcial e seletiva do colesterol e outros lipídios da HDL para a célula. A partícula HDL sem esses lipídios se dissocia para recircular na corrente sangüínea e extrair mais lipídios dos remanescentes dos quilomícrons e das VLDL. Essas mesmas partículas também podem captar o colesterol estocado nos tecidos extra-hepáticos e transportá-lo para o fígado por meio de vias de **transporte reverso do colesterol**.

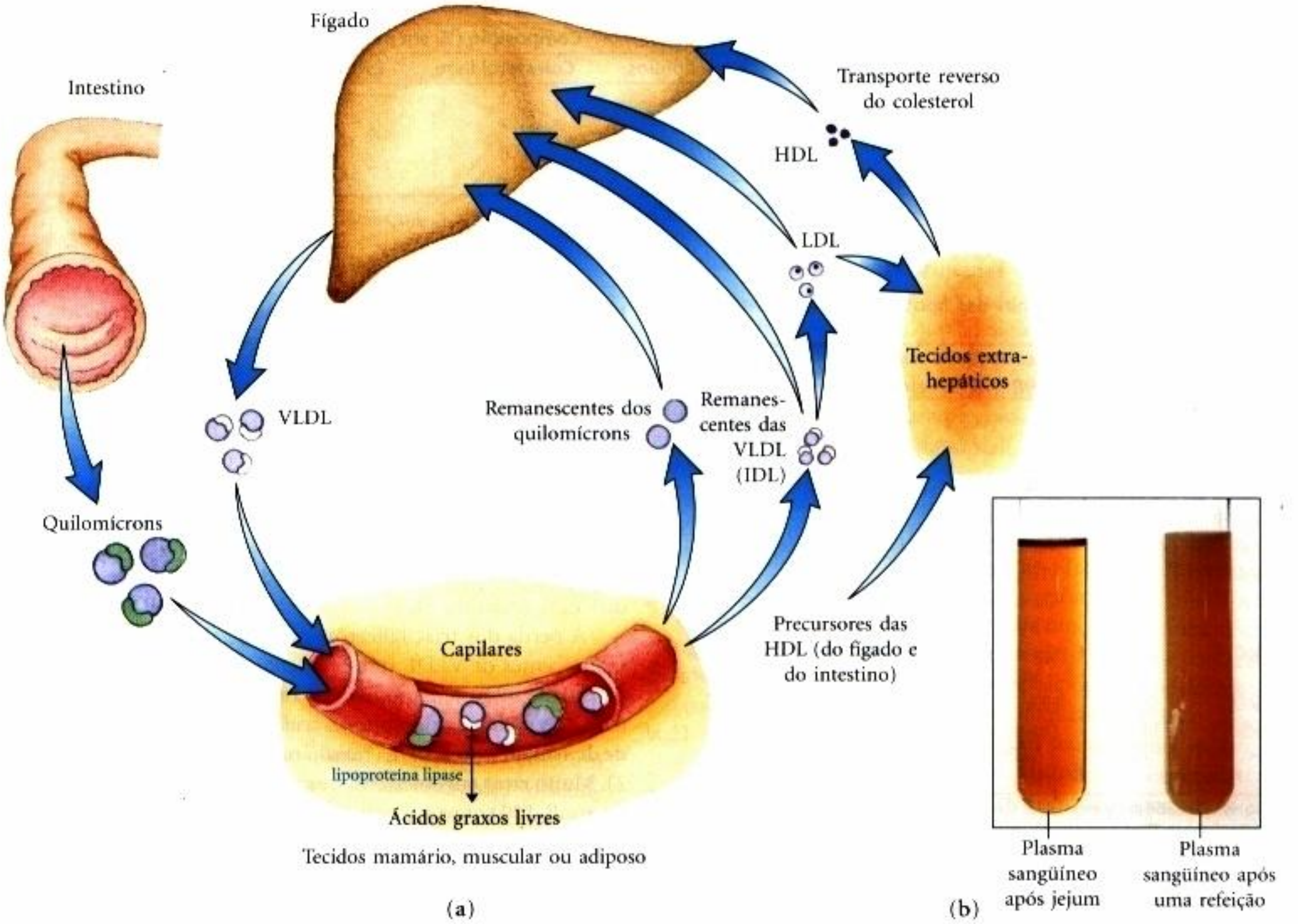

Fígado
Intestino
Transporte reverso do colesterol
HDL
LDL
Tecidos extra-hepáticos
VLDL
Remanescentes dos quilomícrons
Remanescentes das VLDL (IDL)
Quilomícrons
Capilares
Precursores das HDL (do fígado e do intestino)
lipoproteína lipase
Ácidos graxos livres
Tecidos mamário, muscular ou adiposo
(a)
(b)
Plasma sangüíneo após jejum
Plasma sangüíneo após uma refeição

Figura 21-38 – O transporte dos lipídios e lipoproteínas. (**a**) Os lipídios são transportados na corrente sangüínea como lipoproteínas que existem em diversas variantes, cada uma com funções diferentes, composições lipídicas e protéicas diferentes (veja as Tabelas 21-2 e 21-3) e, portanto, diferentes densidades. Os lipídios provenientes da alimentação são empacotados nos quilomícrons; a maior parte de seu conteúdo em triacilgliceróis é liberada para os tecidos adiposo e muscular pela lipoproteína lipase durante o transporte através dos capilares. Os remanescentes dos quilomícrons (contendo pricipalmente proteína e colesterol) são captados pelo fígado. Lipídios endógenos e colesterol do fígado são liberados para os músculos e para os adipócitos pelas VLDL. A extração de lipídios das VLDL (junto com a perda de algumas das lipoproteínas) convertem gradualmente parte delas em LDL, estas transportam o colesterol para os tecidos extra-hepáticos ou são captadas de novo pelo fígado. O fígado capta remanescentes das LDL, VLDL e quilomícrons por meio do processo de endocitose mediada por receptores. O excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos é transportado de volta ao fígado como HDL. No fígado parte do colesterol é transformada em sais biliares. (**b**) Amostras de plasma sangüíneo coletadas depois de um período de jejum adequado (à esquerda) e depois de uma refeição rica em gorduras (à direita). Os quilomícrons produzidos depois de uma refeição gordurosa dão ao plasma uma aparência leitosa.

Adendo 21-3

Os alelos da apolipoproteína E predizem a incidência da doença de Alzheimer

Na população humana ocorrem três formas comuns, ou alelos, do gene que codifica a apoE. A mais freqüente delas é a *APOE3* e representa perto de ~78% dos alelos humanos, as outras formas, *APOE4* e *APOE2*, representam 15% e 7%, respectivamente. O alelo *APOE4* é particularmente comum nas pessoas com doença de Alzheimer e a relação entre ambos é muito preditiva. Indivíduos que herdam o alelo *APOE4* têm um risco muito maior de aparecimento tardio da doença de Alzheimer. Aquelas que são homozigotas para o alelo *APOE4* correm um risco 16 vezes maior de desenvolver a doença, e a idade média de início está pouco abaixo dos 70 anos. Entretanto, para as pessoas que herdam duas cópias do alelo *APOE3* a idade média de início da doença excede os 90 anos.

A base molecular para a associação entre *APOE4* e a doença de Alzheimer ainda não é conhecida. Especula-se sobre um possível papel para apoE na estabilização do citoesqueleto dos neurônios. As proteínas apoE2 e apoE3 se ligam a outras proteínas associadas com os microtúbulos dos neurônios, enquanto a apoE4 não o faz. Isso pode acelerar a morte dos neurônios. Qualquer que seja o mecanismo que venha a ser confirmado, essas observações prometem expandir nosso conhecimento sobre as funções biológicas das apolipoproteínas.

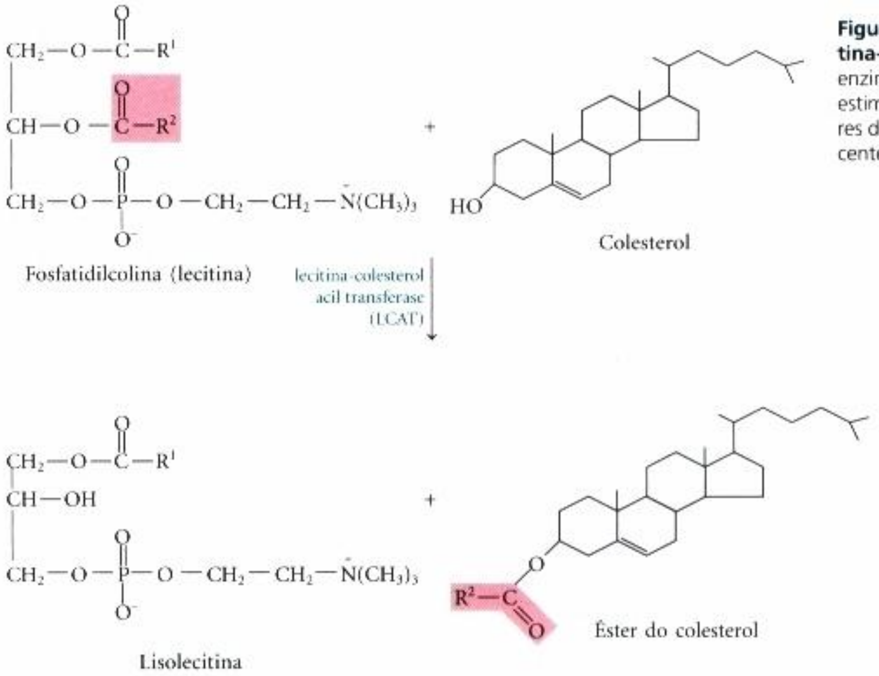

Fosfatidilcolina (lecitina)
Colesterol
lecitina-colesterol acil transferase (LCAT)
Lisolecitina
Éster do colesterol

Figura 21-39 – Reação catalisada pela lecitina-colesterol acil transferase (LCAT). Essa enzima está presente na superfície do HDL e é estimulada pelo seu componente apoA-I. Ésteres de colesteril se acumulam com os HDLs nascentes, convertendo-os a HDLs maduros.

Em uma via de transporte reverso, a interação das HDL nascentes com os receptores SR-BI nas células ricas em colesterol aciona o movimento passivo do colesterol da superfície celular para as HDL, então, estas o transportam de volta ao fígado. Em uma segunda via, a apoA-1 presente nas HDL esvaziadas interage com um transportador ativo, a proteína ABC1, em uma célula rica em colesterol. A apoA-1 (e presumivelmente a HDL) é captada por endocitose e, então, secretada de novo com uma carga de colesterol que ela transporta para o fígado.

A proteína ABC1 é um membro de uma grande família de transportadores (veja Tabela 12-4), algumas vezes chamados de transportadores ABC porque todos eles possuem cassetes de ligação para o ATP; essas proteínas também possuem dois domínios que atravessam a membrana e seis hélices transmembrana. Essas proteínas transportam vários íons, aminoácidos, vitaminas, hormônios esteróides e sais biliares através da membrana plasmática. A proteína CFTR defeituosa na fibrose cística (veja Adendo 12-4) é uma outra componente da família de transportadores multidrogas.

Os ésteres de colesterol entram nas células por endocitose mediada por receptores

Cada partícula de LDL que circula na corrente sangüínea contém apoB-100 que é reconhecida por proteínas que são receptores de superfície específicos, os **receptores de LDL** nas células que precisam captar o colesterol. A ligação de LDL em um receptor de LDL inicia o processo de endocitose (veja Fig. 2-9), o que traz a LDL e seu receptor associado para o interior da célula dentro de um endossomo (Fig. 21-40). Esse endossomo afinal se funde com um lisossomo, o qual contém enzimas que hidrolisam os ésteres de colesterol, liberando o colesterol e ácidos graxos no interior do citosol. A apoB-100 da LDL é também degradada em aminoácidos, que são liberados no citosol, porém o receptor da LDL escapa da degradação e retorna para a superfície celular, onde ele pode funcionar novamente na captação de nova LDL. A ApoB-100 também está presente nas VLDL mas seu domínio de ligação com o receptor não está disponível para ligação com o receptor de LDL. A conversão de VLDL em HDL expõe esse domínio de ligação com o receptor da apoB-100. Essa via para o transporte do colesterol no sangue e a sua **endocitose mediada por receptores** nos tecidos-alvo foi elucidada por Michael Brown e Joseph Goldstein.

O colesterol que entra nas células por esta via pode ser incorporado nas membranas ou pode ser reesterificado pela ACAT (Fig. 21-36) para armazenamento no interior de gotículas lipídicas citosólicas. O acúmulo de excesso de colesterol intracelular é impedido pela redução da velocidade de síntese do colesterol quando as LDL no sangue suprem colesterol suficiente para as necessidades celulares.

LDL
Recep
Plasm

Michael Brown e Joseph Goldstein

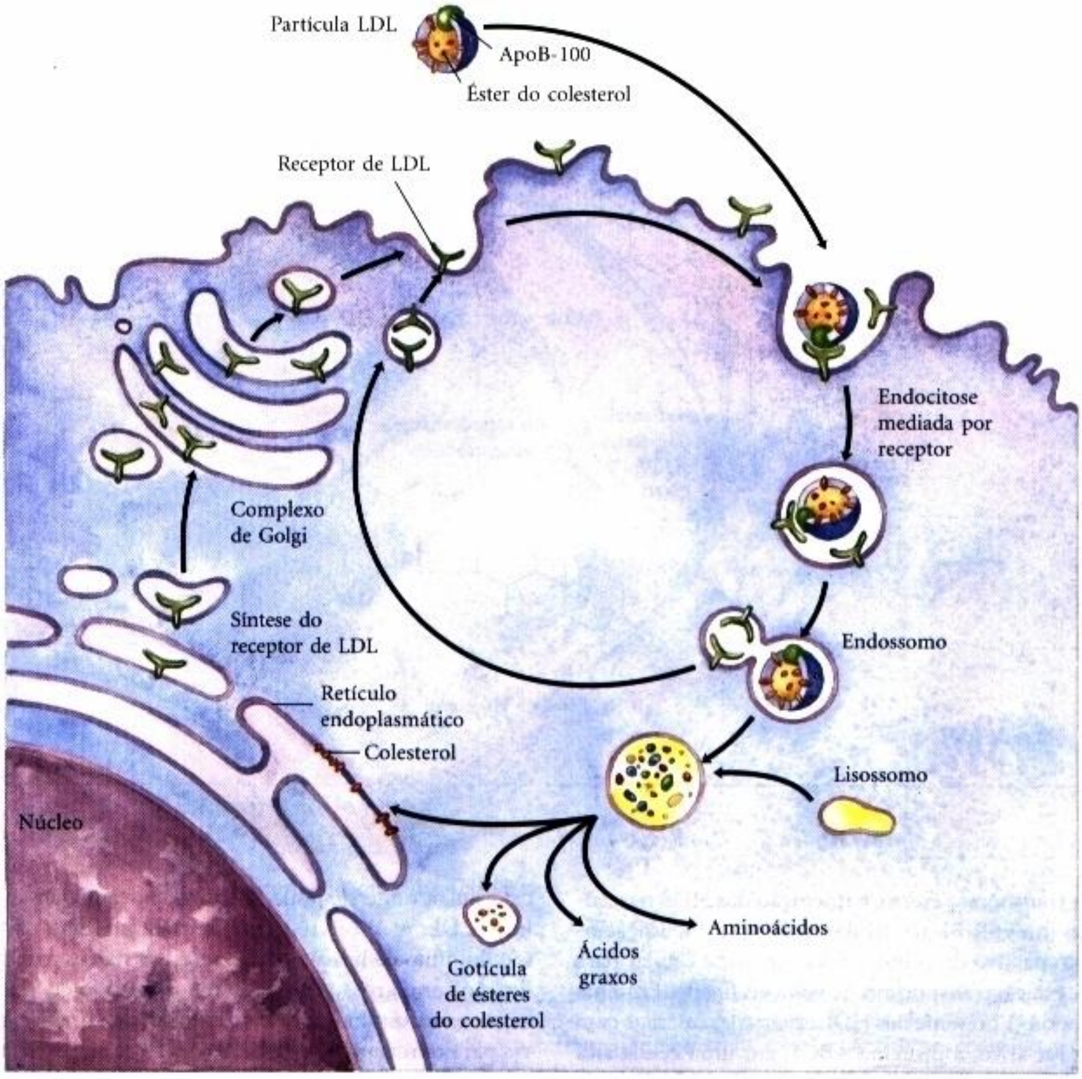


Figura 21-40 – Captação do colesterol por endocitose mediada por receptores. A endocitose está também descrita no Capítulo 2 (pág. 24).

O receptor de LDL também se liga à apoE e desempenha um papel importante na captação hepática dos remanescentes dos quilomícrons e VLDL. Entretanto, se os receptores das LDL não estiverem disponíveis (como, por exemplo, em uma raça de camundongos que não possui o gene para o receptor da LDL), os remanescentes das VLDL e dos quilomícrons ainda podem ser captados pelo fígado mas não as LDL. Isso indica a existência de um sistema de apoio para a endocitose mediada por receptores dos remanescentes das VLDL e dos quilomícrons. Um sistema receptor de apoio é o da proteína relacionada com o receptor de lipoproteína (LRP— "*l*ipotrein *r*eceptor-related *p*rotein") que se liga à apoE bem como a outros ligantes.

A biossíntese do colesterol é regulada por vários fatores

A síntese do colesterol é um processo complexo e energeticamente custoso, assim é claramente vantajoso para um organismo ser capaz de regular a síntese do colesterol, de forma tal que ela simplesmente complemente a quantidade dele ingerida na dieta. Nos mamíferos a produção do colesterol é regulada pela concentração de colesterol intracelular e pelos hormônios glucagon e insulina. O passo limitante na via para o colesterol é a conversão do β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) em mevalonato (Fig. 21-32), a HMG-CoA redutase, a enzima que catalisa essa reação, é uma enzima reguladora complexa, cuja atividade pode sofrer variações de mais de 100 vezes. Altos níveis de um esterol não identificado (talvez o colesterol ou um seu derivado) promovem a degradação rápida dessa enzima e inibe a transcrição de seu gene (Fig. 21-41). A HMG-CoA redutase é também regulada por hormônios. Essa enzima existe nas formas fosforilada (inativa) e desfosforilada (ativa). O glucagon estimula a fosforilação (inativação) e a insulina promove a desfosforilação, ativando a enzima e favorecendo a síntese do colesterol.

Altas concentrações intracelulares de colesterol também ativam a ACAT (Fig. 21-41), o que faz aumentar a esterificação do colesterol para o armazenamento. Finalmente, altas concentrações de colesterol intracelular diminuem a transcrição do gene que codifica o receptor da LDL, isso reduz a produção do receptor e assim a captação do colesterol do sangue.

A produção desregulada de colesterol pode levar a doenças graves. Quando a soma das quantidades do colesterol sintetizado e daquele obtido na dieta excede à quantidade necessária para satisfazer as sínteses de membranas, sais biliares e esteróides, pode ocorrer acúmulo patológico de colesterol nas paredes dos vasos

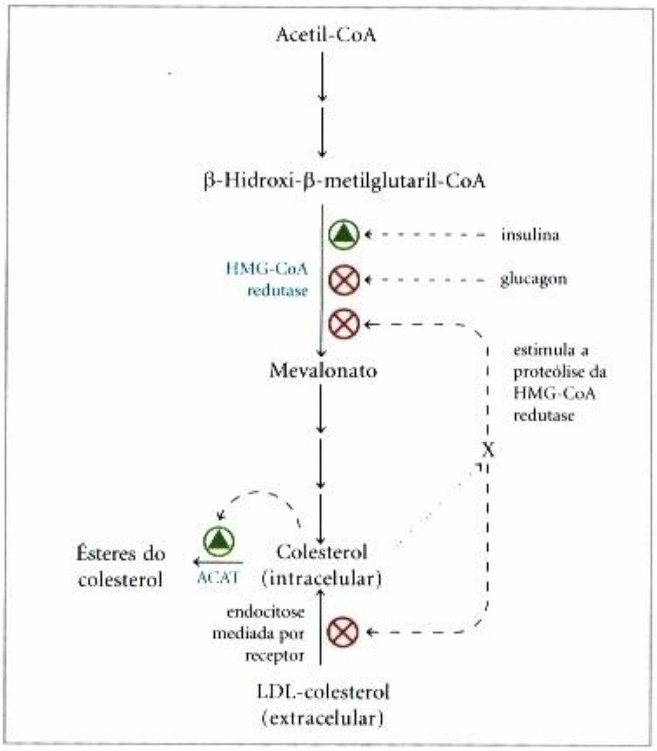

Acetil-CoA
β-Hidroxi-β-metilglutaril-CoA
insulina
HMG-CoA redutase
glucagon
estimula a proteólise da HMG-CoA redutase
Mevalonato
X
Ésteres do colesterol
ACAT
Colesterol (intracelular)
endocitose mediada por receptor
LDL-colesterol (extracelular)

Figura 21-41 – A regulação da biossíntese do colesterol promove o equilíbrio entre a síntese e o colesterol obtido da dieta. O glucagon promove a fosforilação da HMG-CoA redutase e a insulina promove a sua desfosforilação. X representa metabólitos não identificados do colesterol que promovem a proteólise da HMG-CoA redutase.

sangüíneos (placas ateroscleróticas), resultando em obstrução desses vasos (**aterosclerose**). Ataque cardíaco devido à obstrução das artérias coronarianas é uma das causas principais de morte nas sociedades industrializadas. A ocorrência da aterosclerose está ligada aos altos níveis de colesterol no sangue das pessoas e, particularmente, aos altos níveis do colesterol ligado às LDL; existe uma correlação *negativa* entre os níveis de HDL e a doença arterial.

Na doença hereditária conhecida como hipercolesterolemia familial, os níveis de colesterol sangüíneos são extremamente elevados, e os indivíduos atingidos desenvolvem, na infância, aterosclerose severa. O receptor da LDL é defeituoso nesses indivíduos e não ocorre a captação realizada pela LDL e mediada pelo receptor do colesterol. Conseqüentemente, o colesterol obtido na dieta não é retirado do sangue; ele se acumula e contribui para a formação das placas ateroscleróticas. A síntese de colesterol endógeno prossegue mesmo na presença de excesso de colesterol no sangue, porque o colesterol extracelular não pode penetrar no citosol para regular a síntese intracelular (Fig. 21-41). Dois produtos extraídos de fungos, a **lovastatina** e a **compactina**, mostraram resultados promissores no tratamento de pacientes com hipercolesterolemia familial. Esses dois compostos são parecidos com o mevalonato assim como vários outros compostos que são seus análogos sintéticos (Fig. 21-42). Ambas são inibidores competitivos da HMG-CoA redutase e reduzem assim a síntese do colesterol. O tratamento com lovastatina pode diminuir em até 30% o colesterol do soro nos indivíduos que transportam uma cópia defeituosa do gene para o receptor da LDL. Essa droga é ainda mais efetiva quando combinada com uma resina que, quando ingerida, se liga aos sais biliares no intestino e previnem a reabsorção deles.

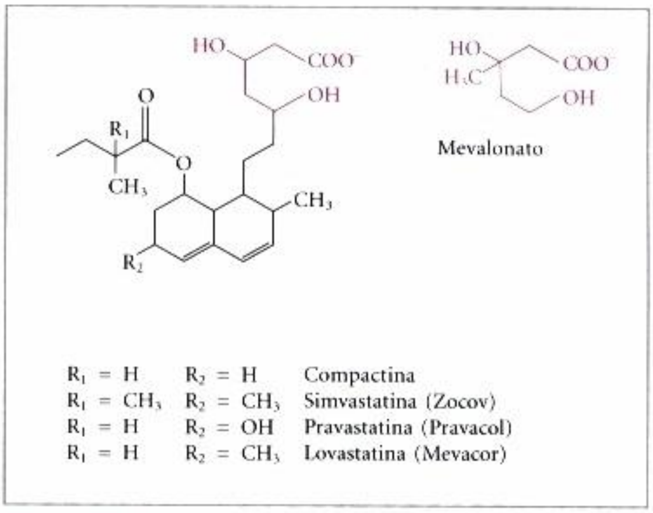
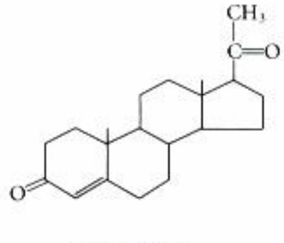

HO
COO⁻
OH
O
R₁
O
CH₃
CH₃
R₂
HO
H₃C
COO⁻
OH
Mevalonato
R₁ = H R₂ = H Compactina
R₁ = CH₃ R₂ = CH₃ Simvastatina (Zocov)
R₁ = H R₂ = OH Pravastatina (Pravacol)
R₁ = H R₂ = CH₃ Lovastatina (Mevacor)

Figura 21-42 – Inibidores da HMG-CoA sintase. Comparação entre as estruturas do mevalonato e quatro compostos que inibem HMG-CoA sintase.

Os níveis de HDL são muito baixos nos portadores da deficiência familial da HDL e quase não detectáveis na doença de Tangier. Essas duas doenças genéticas são o resultado de mutações na proteína ABC1, mencionada anteriormente. A HDL desprovida de colesterol não pode captá-lo das células que não possuem essa proteína, e a HDL pobre em colesterol é rapidamente retirada de circulação e destruída. A doença de Tangier e a FHA são muito raras (em todo o mundo são conhecidas menos de 100 famílias com a doença de Tangier), mas essas alterações estabeleceram o papel da proteína ABC1 na regulação dos níveis plasmáticos de HDL. Como níveis baixos de HDL no plasma estão correlacionados com alta incidência de doença coronariana, a proteína ABC1 pode ser um alvo útil para drogas que controlam os níveis de HDL.

Os hormônios esteróides são formados por clivagem da cadeia lateral e oxidação do colesterol

Na espécie humana todos os hormônios esteróides são derivados do colesterol (Fig. 21-43). Duas classes de hormônios esteróides são sintetizadas no córtex da glândula adrenal: **mineralocorticóides**, que controlam a reabsorção de íons inorgânicos (Na^+, Cl^- e HCO_3^-) pelos rins, e **glicocorticóides**, que ajudam a regular a gliconeogênese e também reduzem a resposta inflamatória. Os hormônios sexuais são produzidos nas gônadas de ambos os sexos e na placenta. Eles incluem a **progesterona**, que regula o ciclo reprodutivo nas fêmeas, os **andrógenos** (por exemplo, testosterona) e os **estrogênios** (por exemplo, estradiol), que influenciam o desenvolvimento das características sexuais se-



Progesterona

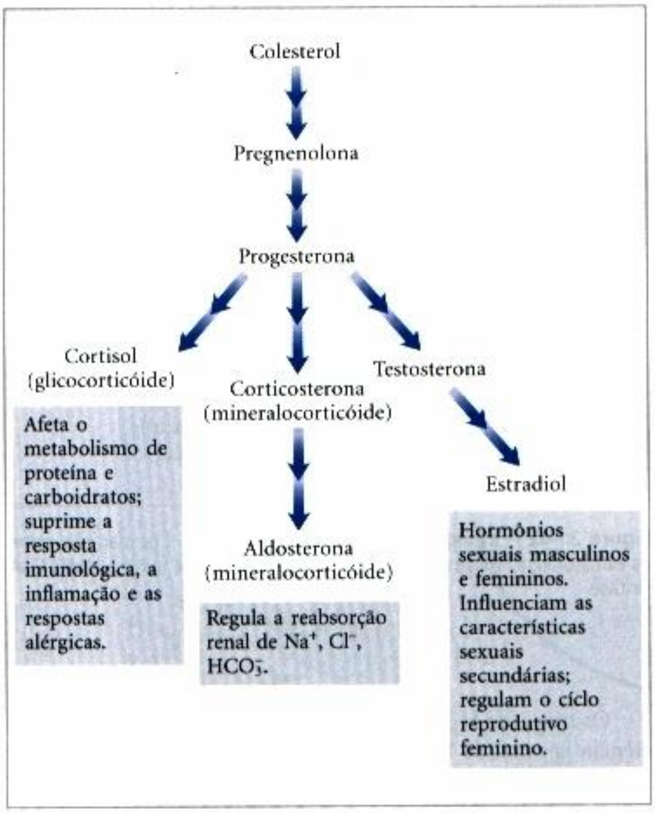

Colesterol
Pregnenolona
Progesterona
Cortisol (glicocorticóide)
Corticosterona (mineralocorticóide)
Testosterona
Afeta o metabolismo de proteína e carboidratos; suprime a resposta imunológica, a inflamação e as respostas alérgicas.
Aldosterona (mineralocorticóide)
Regula a reabsorção renal de Na⁺, Cl⁻, HCO₃⁻.
Estradiol
Hormônios sexuais masculinos e femininos. Influenciam as características sexuais secundárias; regulam o ciclo reprodutivo feminino.

Figura 21-43 – Alguns hormônios esteróides derivados do colesterol. As estruturas de alguns desses compostos estão mostradas na Figura 11-17.

cundárias em machos e fêmeas, respectivamente. Os hormônios esteróides são efetivos ainda quando em concentrações muito baixas e, portanto, são sintetizados em quantidades relativamente pequenas. Em comparação com os sais biliares, sua produção consome relativamente pouquíssimo colesterol.

A síntese dos hormônios esteróides requer a remoção de parte ou de todos os carbonos presentes na cadeia lateral ligada no C-17 do anel D do colesterol. A remoção da cadeia lateral ocorre na mitocôndria dos tecidos que produzem os hormônios esteróides. Ela envolve primeiro a hidroxilação de dois carbonos adjacentes na cadeia lateral (C-20 e C-22) seguida da clivagem de uma ligação entre elas (Fig. 21-44). A formação dos hormônios individuais também envolve a introdução de átomos de oxigênio. Todas as reações de hidroxilação e oxigenação na biossíntese dos esteróides são catalisadas por oxidases de função mista (Adendo 21-1) que empregam NADPH, O_2 e citocromo mitocondrial P-450.

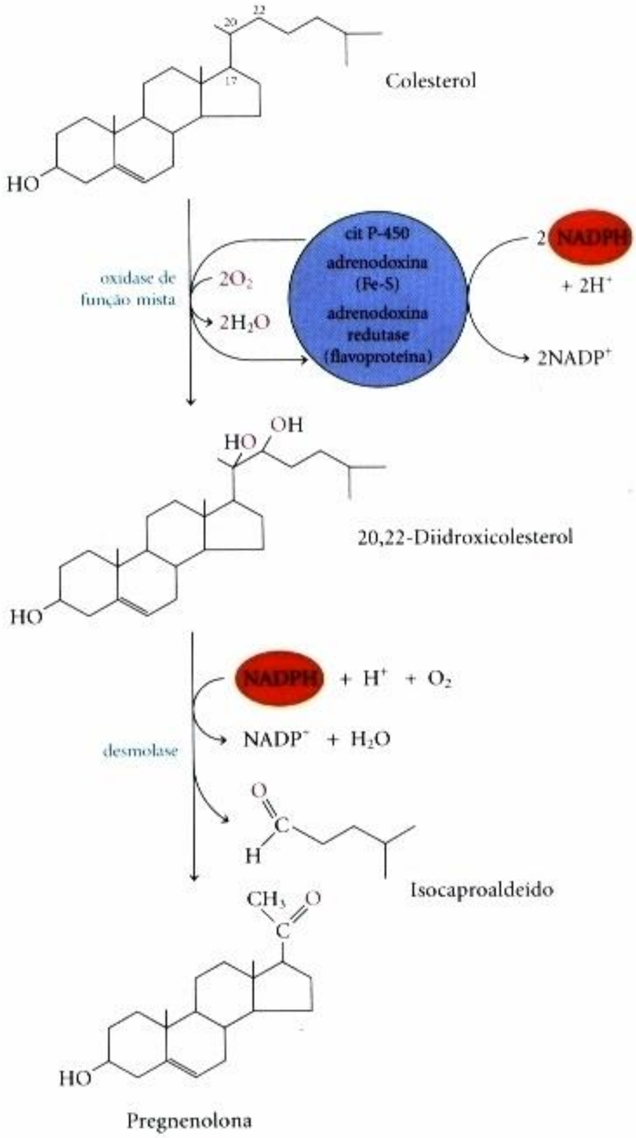

20
22
17
Colesterol
HO
oxidase de função mista
2O₂
2H₂O
cit P-450
adrenodoxina (Fe-S)
adrenodoxina redutase (flavoproteína)
2 NADPH
+ 2H⁺
2NADP⁺
HO
OH
20,22-Diidroxicolesterol
HO
NADPH + H⁺ + O₂
desmolase
NADP⁺ + H₂O
O
C
H
Isocaproaldeido
CH₃
O
C
HO
Pregnenolona

Figura 21-44 – A clivagem da cadeia lateral na síntese de hormônios esteróides. O citocromo P-450 age como um transportador de elétrons neste sistema de oxidases de função mista que oxida carbonos adjacentes. O processo também requer as proteínas transferidoras de elétrons adrenodoxina e adrenodoxina redutase. Este sistema de clivagem da cadeia lateral é encontrado nas mitocôndrias do córtex adrenal, onde ocorre a produção ativa de esteróides. Pregnenolona é o precursor de todos os outros hormônios esteróides (veja Fig. 21-43).

Os intermediários na biossíntese do colesterol têm muitos destinos alternativos

Em adição ao seu papel de intermediário na biossíntese do colesterol, o isopentenil pirofosfato é o precursor ativado de um grande espectro de biomoléculas com diferentes papéis biológicos (Fig. 21-45). Elas incluem as vitaminas A, E e K; diversos pigmentos vegetais como o caroteno e a cadeia fitol da clorofila; borracha natural; muitos óleos essenciais (como os princípios aromáticos do óleo de limão, de eucalipto e do almíscar); hormônio juvenil de insetos, que controlam a metamorfose; dolicóis, que servem como transportadores solúveis de lipídios na síntese de polissacarídeos complexos; e ubiquinona e plastoquinona, transportadores de elétrons na mitocôndria e nos cloroplastos. Mais de 20.000 moléculas isoprenóides diferentes já foram descobertas na natureza e todos os anos é anunciada a descoberta de mais algumas centenas delas.

Prenilação (ligação covalente de um isoprenóide; veja Fig. 27-32) é um mecanismo comum pelo qual proteínas são ancoradas na superfície interna das membranas celulares de mamíferos (veja Fig. 12-13). Em algumas dessas proteínas, o lipídio ligado é o grupo farnesil com 15 átomos de carbono; outros têm o grupo geranil com 20 carbonos. Enzimas diferentes fazem a ligação dos dois tipos de lipídios; é provável que as reações de prenilação destinem as proteínas para membranas diferentes dependendo da natureza do lipídio que for ligado. A prenilação de proteínas é outro papel importante para os derivados do isopreno na via para o colesterol.

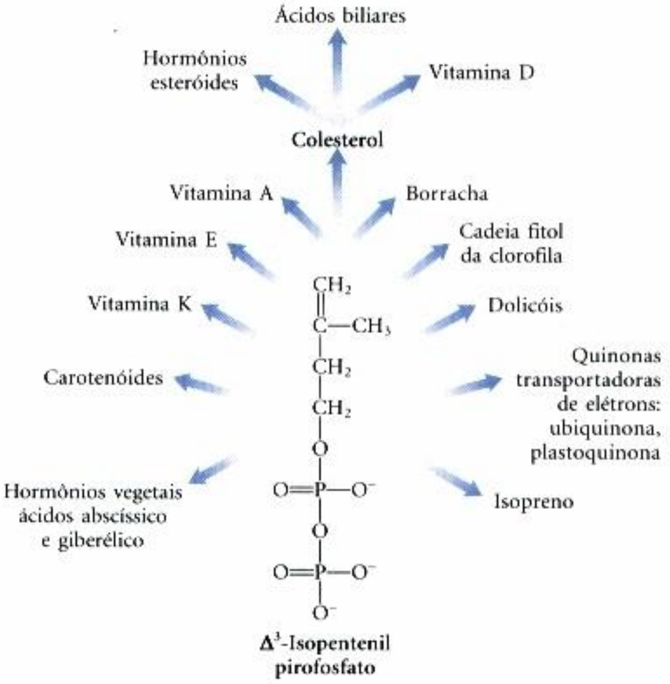

Ácidos biliares
Hormônios esteróides
Vitamina D
Colesterol
Vitamina A
Borracha
Vitamina E
Cadeia fitol da clorofila
Vitamina K
Dolicóis
Carotenóides
Quinonas transportadoras de elétrons: ubiquinona, plastoquinona
Hormônios vegetais ácidos abscíssico e giberélico
Isopreno
CH2
C—CH3
CH2
CH2
O
O=P—O⁻
O
O=P—O⁻
O⁻
Δ³-Isopentenil pirofosfato

Figura 21-45 – Uma visão geral da biossíntese dos isoprenóides. As estruturas da maioria dos produtos finais mostradas aqui estão no Capítulo 11.

Resumo

Ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir do acetil-CoA por um complexo citosólico de seis enzimas mais a proteína transportadora de grupos acil (ACP), a qual contém fosfopantoteína como seu grupo prostético. A ácido graxo sintase, que em alguns organismos consiste em um polipeptídeo multifuncional, contém dois tipos de grupos —SH (um fornecido pela fosfopantoteína da ACP e o outro por um resíduo de cisteína da enzima β-cetoacil-ACP sintase) que funcionam como transportadores dos intermediários acil-graxos. O malonil-ACP, formado a partir de CO_2 e de acetil-CoA (transportado para fora da mitocôndria), condensa-se com um acetil ligado ao —SH de cisteína para formar acetoacetil-ACP e com a liberação de CO_2. A redução para o derivado D-β-hidroxi e sua desidratação para o derivado *trans*-Δ^2-acil-ACP insaturado é seguida pela redução para butiril-ACP. O doador de elétrons é o NADPH para ambos os passos de redução. Mais seis moléculas de malonil-ACP reagem sucessivamente na extremidade carboxila da cadeia do ácido graxo em crescimento, para formar o palmitoil-ACP, o produto final da reação da ácido graxo sintase. O palmitato livre é liberado por hidrólise. A síntese de ácidos graxos é regulada no nível da formação de malonil-CoA.

O palmitato pode ser aumentado para liberar o estearato com 18 átomos de carbono. O palmitato e o estearato por sua vez podem ser dessaturados para liberar palmitoleato e oleato, respectivamente, pela ação de oxidases de função mista. Os mamíferos não podem formar linoleato e precisam obtê-lo de fontes vegetais; eles convertem o linoleato exógeno em araquidonato, o composto progenitor de uma família de substâncias de ação muito potente e semelhantes a hormônios, os eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos).

Os triacilgliceróis são formados pela reação de duas moléculas de acil-CoA graxo com o glicerol 3-fosfato para formar ácido fosfatídico, este é desfosforilado e como um diacilglicerol é, a seguir, acilado por uma terceira molécula de acil-CoA graxo para liberar um triacilglicerol. Todo esse processo é regulado por hormônios. Os triacilgliceróis são transportados no sangue como parte dos quilomícrons. Os diacilgliceróis são os principais precursores dos glicerofosfolipídios. Nas bactérias, a fosfatidilserina é formada pela condensação de serina com CDP-diacilglicerol, e a descarboxilação da fosfatidilserina produz a fosfatidiletanolamina. O fosfatidilglicerol é formado pela condensação de CDP-diacilglicerol com glicerol-3-fosfato seguido pela remoção do fosfato em ligação monoéster. As leveduras empregam vias similares na síntese da fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol; a fosfatidilcolina é formada pela metilação da fosfatidiletanolamina. As células dos mamíferos têm algumas vias um pouco diferentes para sintetizar a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. O grupo cabeça álcool (colina ou etanolamina) é ativado como o derivado ligado à CDP e, então, condensado com o diacilglicerol. A fosfatidilserina é derivada apenas da fosfatidiletanolamina. As sínteses dos plasmalogênios envolvem a formação de sua dupla ligação característica por uma oxidase de função mista. Os grupos cabeça dos esfingolipídios são ligados por meio de mecanismos únicos. Os fosfolipídios são transportados aos seus destinos intracelulares pelas vesículas de transporte ou por proteínas específicas.

O colesterol é formado a partir de acetil-CoA em uma série complexa de reações e com a participação de intermediários que são: β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA, mevalonato e dois isoprenos ativados, o dimetilalil pirofosfato e o isopentenil pirofosfato. A condensação de unidades de isopreno produz o esqualeno, que sendo não-cíclico é ciclizado para liberar o anel esteróide e sua cadeia lateral. A síntese do colesterol é inibida por níveis elevados de colesterol intracelular. O colesterol e os ésteres do colesterol são transportados no sangue por meio de lipoproteínas plasmáticas. Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) transportam colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis do fígado para outros tecidos, onde os triacilgliceróis são degradados pela lipase lipoprotéica, convertendo VLDL em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A LDL, rica em colesterol e nos seus ésteres, é captada por endocitose mediada por receptores, nessa endocitose a apolipoproteína B-100 da LDL é reconhecida pelos receptores de LDL existentes na membrana plasmática. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) funcionam como removedores do colesterol do sangue, transportando-o para o fígado. As condições dietéticas ou defeitos genéticos no metabolismo do colesterol podem levar as pessoas a sofrerem de aterosclerose e de doenças cardíacas.

Os hormônios esteróides (glicocorticóides, mineralocorticóides e hormônios sexuais) são produzidos do colesterol por alteração da cadeia lateral e pela introdução de átomos de oxigênio no sistema do anel esteróide. Além do colesterol, uma larga variedade de compostos isoprenóides é derivada do mevalonato por meio de condensações do isopentenil pirofosfato e do dimetilalil pirofosfato. A prenilação de determinadas proteínas representa sua marcação para a associação com membranas celulares e é essencial para suas atividades biológicas.

Leitura Adicional

As referências gerais encontradas nos Capítulos 11 e 17 também serão muito úteis.

Geral

Bell SJ, Bradley D, Forse RA & Bistrian BR. (1997) The new dietary fats in health and disease. *J. Am. Dietetic Assoc.* **97**, 280-286.

Gotto AMJr (ed). (1987) *Plasma Lipoproteins*, New Comprehensive Biochemistry, Vol. 14 (Neuberger A & van Deenen LLM, series eds), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Doze revisões cobrindo estrutura, síntese e metabolismo de lipoproteínas, regulação da síntese do colesterol e das enzimas LCAT e lipoproteína lipase.

Hajjar DP & Nicholson AC. (1995) Atherosclerosis. *Am. Sci.* **83**, 460-467.

Uma excelente descrição das bases moleculares dessa doença e as perspectivas de sua terapia.

Hawthorne JN & Ansell GB (eds). (1982) *Phospholipids*, New Comprehensive Biochemistry, Vol. 4 (Neuberger A & van Deenen LLM, series eds), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Excelentes revisões das vias biossintéticas dos glicerofosfolipídios e esfingolipídios, proteínas de transferência de fosfolipídios e montagem de bicamadas.

Ohlrogge J & Browse J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957-970.

Um bom resumo das vias biossintéticas em vegetais.

Vance DE & Vance JE (eds). (1996) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, New Comprehensive Biochemistry, Vol. 31, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Biossíntese dos ácidos graxos e dos eicosanóides

Capdevila JH, Falck JR & Estabrook RW. (1992) Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J.* **6**, 731-736.

Esse artigo do FASEB J. contém vinte trabalhos sobre a estrutura e a função de vários citocromos P-450.

Creelman RA & Mullet JE. (1997) Biosynthesis and action o jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**, 355-381.

DeWitt DL. (1999) Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Molec. Pharmacol.* **55**, 625-631.

Uma revisão curta e clara sobre o tópico discutido no Adendo 21-2.

Drazen JM, Israel E & O'Byrne PM. (1999) Drug therapy: treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *New Engl. J. Med.* **340**, 197-206.

Kim KH. (1997) Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxilase. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 77-99.

Lands WEM. (1991) Biosynthesis of prostaglandins. *Annu. Rev. Nutr.* 11, 41-60.

Discussão sobre as necessidades nutricionais de ácidos graxos insaturados e sobre o trabalho bioquímico recente nas vias que vão do araquidonato até as prostaglandinas; nível avançado.

Slabas AR, Brown A, Sinden BS, Swinhoe R, Simon JW, Ashton, AR, Whitfeld PR, & Elborough KM. (1994) Pivotal reactions in fatty acids synthesis. *Prog. Lipid Res.* **33**, 39-46.

Smith S. (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypetide, seven enzymes. *FASEB J.* **8**, 1248-1259.

Smith WL, Garavito RM, & DeWitt DL. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (ciclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **271**, 33157-33160.

Uma revisão concisa das propriedades e funções de COX-1 COX-2.

Biossíntese de fosfolipídios de membrana

Bishop WR & Bell RM. (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracelllular translocation. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**, 579-610.

Revisão de nível avançado da enzimologia e da biologia celular da síntese e direcionamento de fosfolipídios.

Dowhan W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev. Biochem.* **66**, 199-232.

Kennedy EP. (1962) The metabolism and function of complex lipids. *Harvey Lectures* **57**, 143-171.

Uma descrição clássica do papel bioquímico dos nucleotídeos de citidina na síntese dos fosfolipídios.

Pavlidis P, Ramaswami M & Tanouye MA. (1994) The Drosophyla *easily shoked* gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell* **79**, 23-33.

As fascinantes conseqüências da alteração da composição em lipídios das membranas celulares da mosca das frutas.

Raetz CRH & Dowhan W. (1990) Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1235-1238.

Uma breve revisão da biossíntese de fosfolipídios e lipopolissacarídeos bacterianos.

Biossíntese do colesterol, dos esteróides e dos isoprenóides

Bittman R (ed). (1997) *Subcelluar Biochemistry*, Cholesterol: Its functions and Metabolism in Biology and Medicine, Vol. 28, Plenum Press, New York.

Bloch K. (1965) The biological synthesis of cholesterol. *Science* **150**, 19-28.

O discurso do autor na cerimônia de entrega do Prêmio Nobel, uma descrição clássica da síntese do colesterol nos animais.

Chang TY, Chang CCY, & Cheng D. (1997) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 613-638.

Edwards PA & Ericsson J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 157-185.

Goldstein JL & Brown MS. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-430.

A regulação alostérica e covalente das enzimas da via do mevalonato; inclui uma pequena discussão sobre a prenilação da Ras e de outras proteínas.

Knopp RH. (1999) Drug therapy: drug treatment of lipid disorders. *New Eng. J. Med.* **341**, 498-511.

Revisão do emprego dos inibidores da HMG-CoA e de resinas ligadoras de ácidos biliares na redução do colesterol no soro sangüíneo.

Krieger M. (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 523-558.

Lawrence CM, Rodwell VW, & Stauffacher CV. (1995) Crystal structure of *Pseudomonas mevalonii* HMG-CoA reductase at 3.0 angstrom resolution. *Science* **268**, 1758-1762.

McGarvey DJ & Croteau R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.

Uma descrição da surpreendente diversidade dos isoprenódes em plantas.

Olson RE. (1998) Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.* **128** (2 suppl.), 439S-443S.

Descrição breve e clara da história do conhecimento das funções das lipoproteínas.

Strittmatter WJ & Roses AD. (1995) Apoliprotein E and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4725-4727.

Young SG & Fielding CJ. (1999) The ABCs of cholesterol efflux. *Nature Genet.* **22**, 316-318.

Breve revisão de três artigos no mesmo fascículo desse jornal estabelecendo que as mutações na ABC1 causam a doença de Tangier e deficiência familial da HDL.

Problemas

1. Via do carbono na síntese dos ácidos graxos. Usando o seu conhecimento da biossíntese dos ácidos graxos, forneça uma explicação para as seguintes observações experimentais:

(a) A adição de [^{14}C]acetil-CoA uniformemente marcado a uma fração solúvel do fígado produz palmitato uniformemente marcado com ^{14}C.

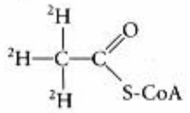
(b) Entretanto, a adição de microquantidades de [^{14}C]acetil-CoA uniformemente marcado, na presença de um excesso de malonil-CoA, a uma fração solúvel do fígado produz palmitato marcado com ^{14}C apenas nos C-15 e C-16.

2. Síntese de ácidos graxos a partir da glicose. Em um indivíduo que ingeriu grandes quantidades de sacarose, a glicose e a frutose que excedem as necessidades calóricas são transformadas em ácidos graxos e estes destinados à síntese de triacilgliceróis. Essa síntese de ácidos graxos consome acetil-CoA, ATP e NADPH. Como cada uma dessas substâncias é produzida a partir da glicose?

3. Equação líquida da síntese dos ácidos graxos. Escreva a equação líquida para a biossíntese do ácido palmítico no fígado do rato, começando do acetil-CoA mitocondrial e do NADPH citosólico, ATP e CO_2.

4. Via do hidrogênio na síntese dos ácidos graxos. Considere uma preparação que contenha todas as enzimas e co-fatores necessários para a biossíntese dos ácidos graxos a partir do acetil-CoA e malonil-CoA adicionados.

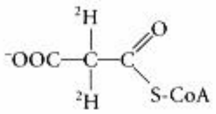
(a) Se o [2-^{2}H]acetil-CoA (marcado com deutério, o isótopo pesado do hidrogênio):



$$^{2}H-C(^{2}H)_2-C(=O)-S\text{-}CoA$$

e um excesso de malonil-CoA são adicionados como substratos, quantos átomos de deutério são incorporados em cada molécula do palmitato? Quais são as suas localizações? Explique.

(b) Se o acetil-CoA não-marcado e o [2-^{2}H]malonil-CoA:



$$^{-}OOC-C(^{2}H)_2-C(=O)-S\text{-}CoA$$

são adicionados como substratos, quantos átomos de deutério são incorporados em cada molécula do palmitato? Quais são as suas localizações? Explique.

5. Energética da β-cetoacil-ACP sintase. Na reação de condensação catalisada pela β-cetoacil-ACP sintase (Fig. 21-5), uma unidade de quatro carbonos é sintetizada pela combinação de uma unidade de dois carbonos com uma de três carbonos e a liberação de uma molécula de CO_2. Qual é a vantagem termodinâmica desse processo sobre um que simplesmente combina duas unidades com dois carbonos cada uma?

6. Modulação da acetil-CoA carboxilase. A acetil-CoA carboxilase é o principal ponto de regulação na biossíntese dos ácidos graxos. Algumas das propriedades dessa enzima são descritas a seguir:

(a) A adição de citrato ou isocitrato eleva a $V_{máx}$ da enzima pelo menos por um fator de 10.

(b) A enzima existe em duas formas interconversíveis que diferem marcadamente nas suas atividades:

$$\text{Protômeros (forma inativa)} \rightleftharpoons \text{polímero filamentoso (forma ativa)}$$

O citrato e o isocitrato ligam-se preferencialmente à forma filamentosa, enquanto o palmitoil-CoA liga-se preferencialmente ao protômero.

Explique como essas propriedades são consistentes com o papel regulador da acetil-CoA carboxilase na biossíntese dos ácidos graxos.

7. Transporte dos grupos acetil através da membrana mitocondrial interna. O grupo acetil do acetil-CoA produzido pela descarboxilação oxidativa do piruvato na mitocôndria é transferido para o citosol pelo transportador de grupos acetil esquematizado na Figura 21-11.

(a) Escreva a equação global para a transferência de um grupo acetil da mitocôndria para o citosol.

(b) Qual é o custo desse processo em moles de ATP por grupo acetil?

(c) No Capítulo 17 encontramos um transportador de grupo acil na transferência de acil-CoA do citosol para a mitocôndria em preparação para a β-oxidação (veja Fig. 17-6). Um resultado daquele transportador era a separação dos conjuntos mitocondrial e citosólico do CoA. O transportador de grupos acetil também realiza esse trabalho?

8. Requerimento de oxigênio pelas dessaturases. A biossíntese de palmitoleato (Fig. 21-13), um ácido graxo insaturado comum com uma dupla ligação *cis* na posição Δ^9, emprega palmitato como precursor. Isto pode ser realizado em condições anaeróbicas estritas? Explique.

9. Custo energético da síntese dos triacilgliceróis. Mostre, por uma equação líquida apropriada para a biossíntese do tripalmitoilglicerol (tripalmitina) a partir do glicerol e ácido palmítico, quantos ATP são necessários por molécula de tripalmitina formada.

10. Reciclagem dos triacilgliceróis do tecido adiposo. Não ocorre qualquer aumento na quantidade total de triacilgliceróis armazenados quando a $[^{14}C]$glicose é adicionada à dieta balanceada de ratos adultos, entretanto os triacilgliceróis tornam-se marcados com o ^{14}C. Explique.

11. O custo energético da síntese da fosfatidilcolina. Escreva a seqüência de etapas e a reação líquida para a biossíntese da fosfatidilcolina pela via de recuperação a partir de oleato, palmitato, diidroxiacetona fosfato e colina. Iniciando com esses precursores, qual é o custo, em número de moles de ATP, da síntese da fosfatidilcolina pela via de recuperação?

12. Síntese da fosfatidilcolina pela via de recuperação. Um rato jovem é mantido em uma dieta deficiente em metionina e não consegue crescer até que a colina seja adicionada à dieta. Explique.

13. Síntese de isopentenil pirofosfato. Caso o 2-$[^{14}C]$acetil-CoA for adicionado a um homogeneizado de tecido hepático de rato que está sintetizando colesterol, onde irá aparecer o ^{14}C na molécula de Δ^3-isopentenil pirofosfato, a forma ativada de uma unidade de isopreno?

14. Doadores ativados na síntese de lipídios. Durante a biossíntese de lipídios complexos, os componentes são montados por transferência do grupo adequado de um doador ativado. Por exemplo, o doador ativado dos grupos acetil é o acetil-CoA. Indique o doador ativado para cada um dos seguintes grupos: (a) fosfato; (b) D-glicosil; (c) fosfoetanolamina; (d) D-galactosil; (e) acil-graxo; (f) metil; (g) o grupo de dois carbonos que participa da biossíntese de ácidos graxos; (h) Δ^3-isopentenil.

15. Importância das gorduras da dieta. Quando ratos jovens são colocados em uma dieta totalmente livre de gorduras, eles crescem muito pouco, desenvolvem uma dermatite escamosa, perdem o pêlo e morrem em tempo curto — esses sintomas podem ser prevenidos pela administração de linoleato ou material vegetal junto com os alimentos. Por que o linoleato é um ácido graxo essencial? Por que o material vegetal pode substituí-lo?

16. Regulação da biossíntese do colesterol. Na espécie humana o colesterol pode ser obtido da alimentação ou por síntese a partir de precursores simples. Uma pessoa adulta em dieta com pouco colesterol sintetiza no fígado, em média, 600mg de colesterol por dia. Se o colesterol estiver presente na dieta essa síntese é reduzida drasticamente. Como ocorre essa regulação?

17. ApoE e aterosclerose. Uma espécie de camundongos de laboratório que não expressa o gene para a proteína apoE tem níveis elevados de LDL. Quando recebem uma dieta normal, eles desenvolvem atoresclerose. Como a falta de apoE pode provocar esse aumento dos níveis de LDL?

CAPÍTULO 22

Biossínteses de Aminoácidos, Nucleotídeos e Moléculas Relacionadas

A contribuição do nitrogênio para a massa total dos sistemas vivos é menor somente que as respectivas contribuições de carbono, hidrogênio e oxigênio. A maior parte desse nitrogênio está ligada nos aminoácidos e nos nucleotídeos. Todos os aspectos do metabolismo dos compostos biológicos nitrogenados serão estudados neste capítulo, com exceção do catabolismo dos aminoácidos, que foi estudado no Capítulo 18.

Existem várias razões para a discussão conjunta das vias biossintéticas que levam aos aminoácidos e aos nucleotídeos, não só porque ambas as classes de moléculas contêm nitrogênio (o qual nasce de fontes biológicas comuns), mas também porque os dois conjuntos de vias metabólicas são extensivamente imbricadas, compartilhando vários intermediários. Alguns aminoácidos, ou partes deles, são incorporados nas estruturas das bases purínicas e pirimidínicas e, em um caso, uma porção do anel de uma base purínica é incorporada na estrutura de um aminoácido (histidina). Os dois conjuntos de vias compartilham também muitos passos químicos comuns, em particular um grande número de reações envolvendo a transferência do nitrogênio ou de grupos monocarbônicos.

As vias descritas nas páginas seguintes podem ser intimidadoras para o estudante principiante em bioquímica. A sua complexidade evidente nasce não tanto das reações químicas envolvidas, em muitos casos elas são relativamente fáceis de compreender, mas também do vasto número de passos e da complexidade estrutural de muitos dos intermediários. Essas vias podem ser mais bem abordadas, mantendo-se a atenção nos princípios metabólicos gerais já discutidos, nos intermediários-chave que comparecem em cada reação, nos precursores e nas classes comuns de reações, que são recorrentes no curso do metabolismo. Mesmo uma vista rápida nas reações químicas pode ser recompensadora, já que, nessas vias, ocorrem algumas das transformações químicas mais incomuns encontradas nos sistemas biológicos. Por exemplo, aqui são encontrados exemplos proeminentes do raro emprego biológico dos metais molibdênio, selênio e vanádio. O esforço também recebe um dividendo prático, especialmente para os estudantes de medicina humana ou veterinária. Muitas doenças genéticas da espécie humana e de animais foram identificadas pela ausência de uma ou mais das enzimas pertencentes a essas vias. Muitas drogas farmacêuticas, empregadas no combate de doenças infecciosas, são inibidoras de enzimas dessas vias, como também o são os agentes mais importantes na quimioterapia do câncer.

A regulação dessas vias de biossíntese dos compostos, que contêm nitrogênio, é crucial. Como cada um dos aminoácidos e nucleotídeos são necessários em quantidades relativamente pequenas, o fluxo metabólico através da maioria dessas vias não é tão grande quanto o fluxo biossintético que leva a carboidratos e a gorduras nos tecidos animais. Ainda, porque os diferentes aminoácidos e nucleotídeos precisam ser feitos nas relações corretas e no tempo certo para a síntese de proteínas e de ácidos nucléicos, as suas vias biossintéticas precisam ser cuidadosamente reguladas e coordenadas umas com as outras. A concentração de aminoácidos e nucleotídeos, que são moléculas com carga elétrica, também precisa ser regulada de forma a manter o equilíbrio osmótico da célula. Como discutido nos capítulos anteriores, as vias podem ser reguladas por mudanças, quer na atividade, quer na quantidade das enzimas envolvidas. As vias apresentadas neste capítulo fornecem alguns dos exemplos mais bem compreendidos da regulação da atividade enzimática. Uma discussão geral sobre a regulação das quantidades de diferentes enzimas presentes em uma dada célula (isto é, da sua síntese e degradação) pode ser encontrada no Capítulo 28.

O trevo pé-de galinha florido. As bactérias nos nódulos dessa e outros legumes convertem o nitrogênio atmosférico em formas reduzidas requeridas por todos os organismos vivos.

Visão Geral do Metabolismo do Nitrogênio

As vias biossintéticas dos aminoácidos e dos nucleotídeos compartilham a necessidade de nitrogênio. Mas, em geral, os compostos de nitrogênio solúveis e biologicamente úteis são escassos nos ambientes naturais e, por essa razão, a amônia, os aminoácidos e os nucleotídeos são empregados de maneira muito econômica pela maioria dos organismos. De fato, veremos que aminoácidos, bases purinas e pirimidinas livres formados durante a reciclagem metabólica são, com freqüência, recuperados e reempregados. Examinaremos primeiro as vias pelas quais o nitrogênio do meio ambiente é introduzido nos sistemas biológicos.

O ciclo do nitrogênio mantém parte da massa desse elemento em compostos biologicamente disponíveis

Quatro quintos da atmosfera terrestre são constituídos por nitrogênio molecular (N_2) e essa é a fonte mais abundante desse elemento. Entretanto, apenas um número relativamente pequeno de espécies vivas pode converter o nitrogênio atmosférico em formas químicas úteis para os organismos vivos; por essa razão, os processos metabólicos de todos eles funcionam de uma forma interdependente de maneira a recuperar e reempregar o nitrogênio biologicamente disponível. Esse conjunto de processos constitui o vasto **ciclo do nitrogênio** (Fig. 22-1). O primeiro passo no ciclo do nitrogênio é a **fixação** (redução) do nitrogênio atmosférico por bactérias fixadoras de nitrogênio e que produzem amônia (NH_3 ou NH_4^+). Embora a amônia possa ser empregada pela maioria dos organismos vivos, são tão abundantes e ativas as bactérias do solo que obtêm a energia de que necessitam pela oxidação da amônia em nitrito (NO_2^-), e, em última instância, nitrato (NO_3^-), pois praticamente toda a amônia que atinge o solo é transformada em nitrato por oxidação. Esse processo é conhecido por **nitrificação.** Muitas bactérias e vegetais podem reduzir facilmente o nitrato até amônia pela ação das nitrato e nitrito redutases. Formada dessa maneira pelos vegetais, a amônia pode ser empregada na síntese dos aminoácidos, estes são, então, usados pelos animais como fonte de aminoácidos não-essenciais e essenciais para sintetizarem suas proteínas. Quando os organismos morrem, a degradação microbiológica das suas proteínas devolve a amônia ao solo, onde as bactérias nitrificantes a convertem em nitrito e nitrato outra vez. As bactérias que convertem nitrato em N_2 em condições anaeróbicas fazem com que seja mantido o equilíbrio entre o nitrogênio fixado e o nitrogênio atmosférico. Nesse processo, chamado de **desnitrificação** (Fig. 22-1), essas bactérias do solo empregam NO_3^- em lugar do O_2 como o último receptor de elétrons em uma série de reações que, como a fosforilação oxidativa, gera um gradiente transmembrana de prótons, que é empregado para sintetizar ATP.

Examinemos agora o processo de fixação do nitrogênio, o primeiro passo no ciclo desse elemento.

O nitrogênio é fixado por enzimas do complexo da nitrogenase

Apenas alguns procariotos podem fixar nitrogênio atmosférico. São capazes de fixar o nitrogênio atmosférico: as cianobactérias, que habitam os solos e as águas salgadas e doces, bem como outras espécies de bactérias de vida livre no solo, como as espécies *Azotobacter*. Outras bactérias fixadoras do nitrogênio vivem como **simbiontes** nos nódulos das raízes das plantas leguminosas. Em todos esses organismos, o primeiro produto importante da fixação do nitrogênio atmosférico é a amônia, que pode ser usada por outros seres vivos, quer diretamente, quer depois de sua conversão em outros compostos solúveis, como nitritos, nitratos ou aminoácidos.

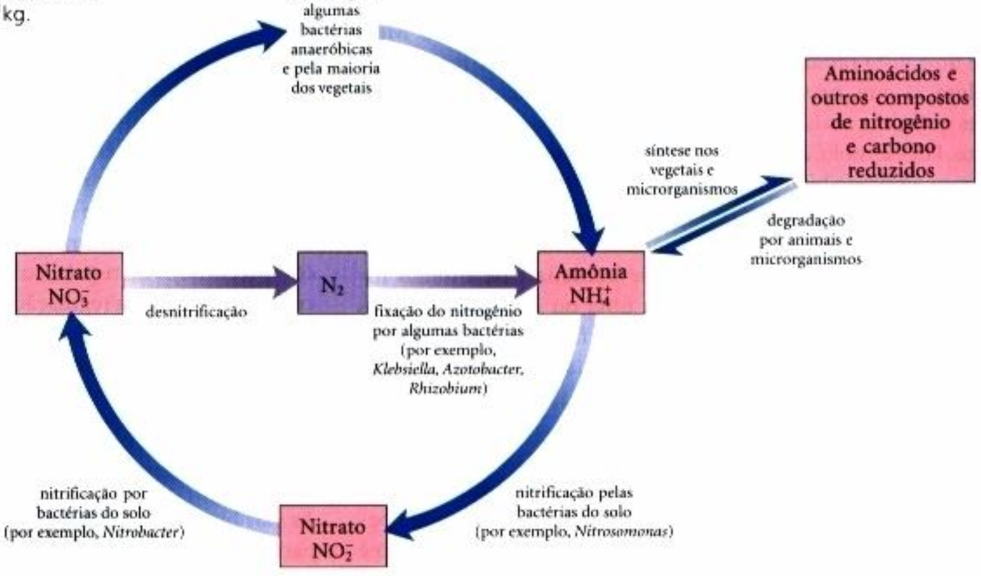
A redução do nitrogênio em amônia é uma reação exergônica:

$$N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3 \qquad \Delta G'^{\circ} = -33{,}5\text{kJ/mol}$$

A tripla ligação N≡N é, entretanto, muito estável, com uma energia de ligação de 942kJ/mol. Portanto, a fixação do nitrogênio tem uma energia de ativação extremamente alta e o nitrogênio atmosférico é quase quimicamente inerte nas condições normais. A amônia é produzida industrialmente pelo processo Haber (de Fritz Haber, o inventor) que, para obter a energia de ativação necessária, emprega uma mistura de H_2 e N_2 submetida a temperaturas de 400 a 500°C e a pressões de dezenas de milhares de quilopascals (várias centenas de atmosferas). A fixação biológica do nitrogênio precisa ocorrer em uma pressão de nitrogênio de 0,8 atmosfera e junto a temperaturas biológicas. A barreira representada pela energia de ativação alta é vencida, pelo menos, em parte, pela ligação e hidrólise do ATP. A reação final pode ser escrita:

$$N_2 + 10H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_4^+ + 16ADP + 16P_i + H_2$$

Figura 22-1 – O ciclo do nitrogênio. A quantidade total de nitrogênio fixada anualmente na biosfera excede a 10^{11}kg.


redução por algumas bactérias anaeróbicas e pela maioria dos vegetais
Aminoácidos e outros compostos de nitrogênio e carbono reduzidos
síntese nos vegetais e microrganismos
degradação por animais e microrganismos
Nitrato NO_3^-
desnitrificação
N_2
fixação do nitrogênio por algumas bactérias (por exemplo, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Rhizobium*)
Amônia NH_4^+
nitrificação por bactérias do solo (por exemplo, *Nitrobacter*)
Nitrato NO_2^-
nitrificação pelas bactérias do solo (por exemplo, *Nitrosomonas*)

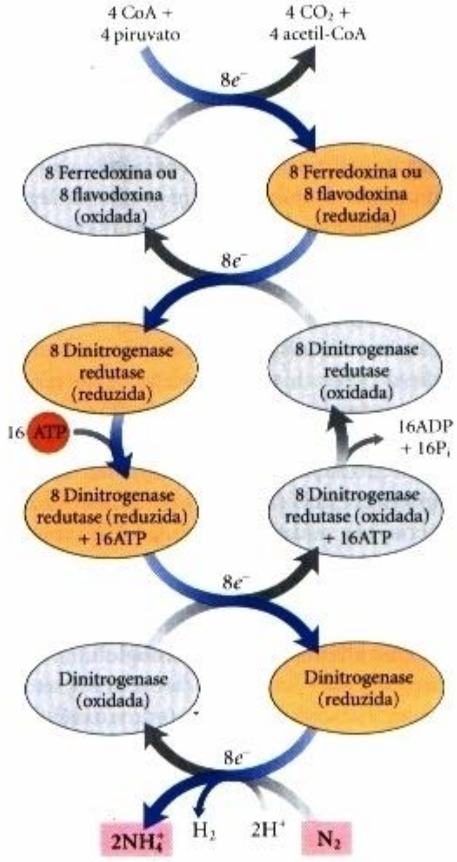


Figura 22-2 – Fixação do nitrogênio pelo complexo da nitrogenase. Os elétrons são transferidos do piruvato para a dinitrogenase por meio da ferredoxina (ou da flavodoxina) e pela dinitrogenase redutase. A dinitrogenase é reduzida pela dinitrogenase redutase por meio da transferência de apenas um elétron de cada vez, e precisa ser reduzida por pelo menos seis elétrons para fixar uma molécula de N_2. Dois elétrons adicionais são empregados para reduzir $2H^+$ para H_2 em um processo que acompanha obrigatoriamente a fixação do nitrogênio em seres anaeróbicos, perfazendo um total de oito elétrons para cada molécula de nitrogênio. As estruturas das subunidades protéicas e os co-fatores metálicos da dinitrogenase redutase e da dinitrogenase estão descritos no texto e na Figura 22-3.

A fixação biológica do nitrogênio é realizada por um complexo de proteínas muito bem preservado pela evolução, denominado de **complexo da nitrogenase** (Fig. 22-2). Os dois componentes principais desse complexo são a **dinitrogenase redutase** e a **dinitrogenase** (Fig. 22-3). A dinitrogenase redutase (M_r 60.000) é um dímero com duas subunidades idênticas. Ela contém um centro redox único 4Fe-4S (veja Fig. 19-5) e pode ser oxidada e reduzida por transferência de apenas um elétron. Ela tem também dois sítios de ligação para a dupla ATP/ADP. A dinitrogenase é um tetrâmero com duas cópias de duas subunidades diferentes (M_r 240.000), contém ferro e molibdênio, e seus centros redox apresentam um total de dois molibdênios, 32 ferros e 30 enxofres por tetrâmero. Perto de metade do ferro e do enxofre está presente participando de dois pares de centros interligados 4Fe-4S, chamados conjuntos P. O restante está presente como parte de um co-fator de ferro e molibdênio. Foi descrita uma forma de nitrogenase, contendo vanádio em vez de molibdênio e algumas espécies bacterianas podem produzir ambos os tipos de sistemas da nitrogenase. A enzima que contém vanádio pode ser o sistema primário de fixação de nitrogênio em algumas condições ambientais, mas isso ainda não foi bem caracterizado.

A fixação do nitrogênio é realizada por uma forma altamente reduzida da dinitrogenase e requer oito elétrons: seis para redução do N_2 e dois para a produção de uma molécula de H_2 como parte obrigatória do mecanismo de reação. A dinitrogenase é reduzida pela transferência de elétrons da dinitrogenase redutase (Fig. 22-2). A dinitrogenase tem dois sítios de ligação para a redutase e os oito elétrons necessários são transferidos para a dinitrogenase, um por vez; a cada ciclo, a redutase reduzida é ligada à dinitrogenase e a redutase oxidada dissocia-se da dinitrogenase, repetindo o ciclo. Esse ciclo necessita de que o ATP seja hidrolisado pela redutase. A fonte imediata de elétrons para reduzir a dinitrogenase redutase é variada com a ferredoxina reduzida (pág. 548; veja também Fig. 19-5), com a flavodoxina reduzida e, talvez, com outras fontes que desempenham um papel em alguns sistemas. Em, pelo menos, um caso, a última fonte de elétrons é o piruvato (Fig. 22-2).

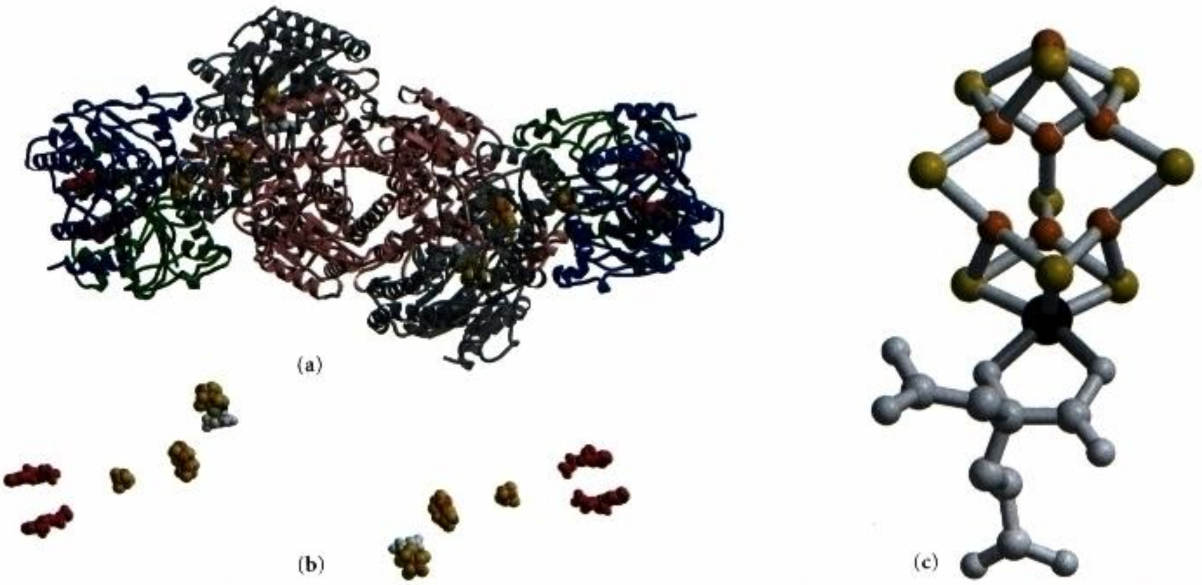
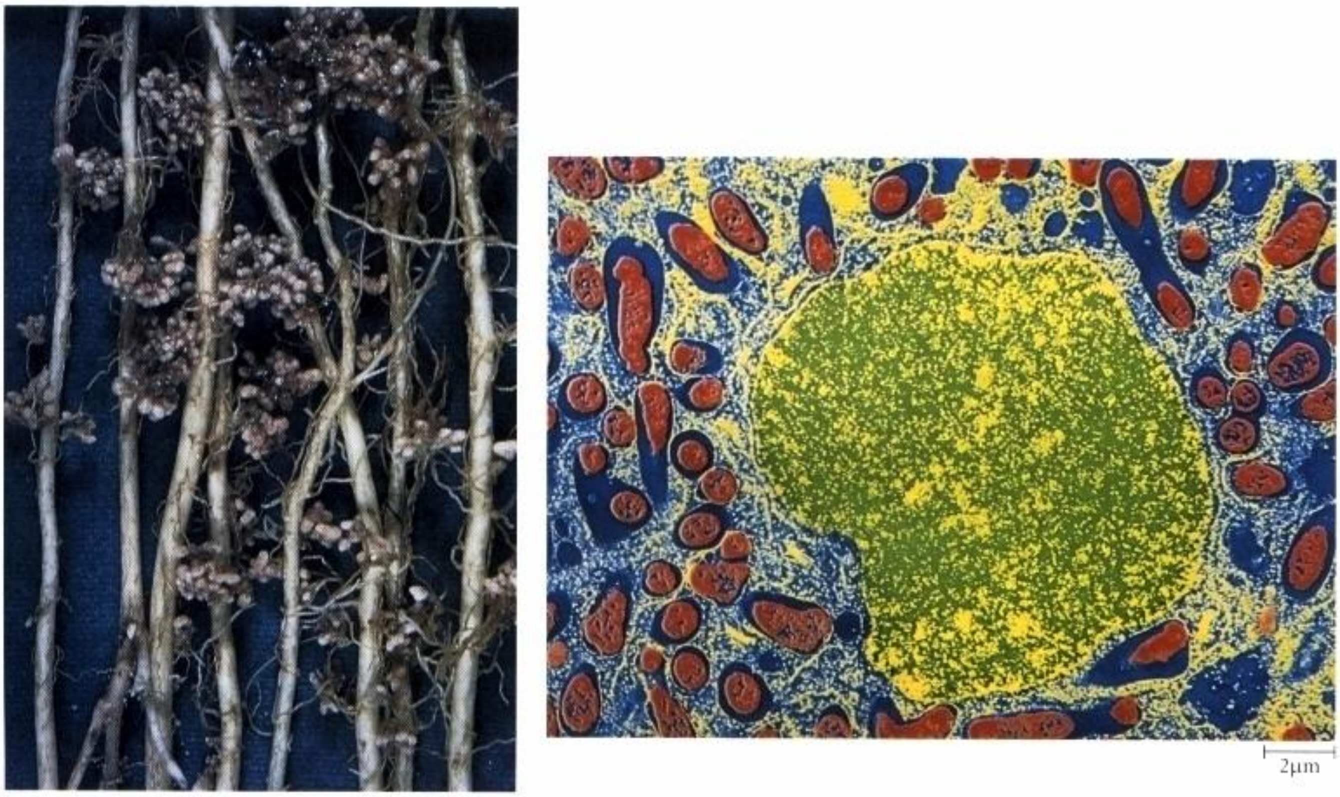


Figura 22-3 – Enzimas e co-fatores do complexo da nitrogenase. (**a**) Neste diagrama em fita as subunidades da dinitrogenase são mostradas em cinza e rosa, as subunidades da dinitrogenase redutase estão em azul e verde. O ADP ligado está em vermelho. Note o complexo 4Fe-4S (os átomos de Fe estão em alaranjado e os de enxofre em amarelo) e o co-fator Fe-Mo (Mo em preto, homocitrato em cinza-claro). Também estão mostrados os agregados P (pares de 4Fe-4S interligados). (**b**) Os complexos de co-fatores da dinitrogenase sem a proteína. As cores são as mesmas empregadas em (**a**). (**c**) O co-fator Fe-Mo contém um Mo (preto), sete Fe (alaranjado), nove S (amarelo) e uma molécula de homocitrato (cinza).

O papel do ATP nesse processo é interessante, pois parece ser catalítico e não termodinâmico. Lembre-se de que o ATP pode contribuir não só com energia química, por meio da hidrólise de uma ou mais de suas ligações fosfodiéster, mas também com energia de ligação (págs. 194 e 274) por meio de interações não-covalentes que podem ser empregadas para diminuir a energia de ativação. Na reação realizada pela dinitrogenase redutase, tanto a ligação do ATP quanto a sua hidrólise produzem mudanças conformacionais na proteína, o que evidentemente ajuda a superar a alta energia de ativação da fixação do nitrogênio. A ligação do ATP na redutase muda o potencial de redução (E'°) dessa proteína de −250 para −400 milivolts, um aumento da sua força redutora que é necessário para a transferência de elétrons para a dinitrogenase. Assim, duas moléculas de ATP são hidrolisadas durante a transferência de cada elétron da dinitrogenase redutase para a dinitrogenase.

Outra importante característica do complexo da nitrogenase é a sua extrema labilidade na presença de oxigênio. A redutase é inativada no ar, com um tempo de meia-vida de 30 segundos. A dinitrogenase tem uma meia-vida de 10 minutos no ar. As bactérias de vida livre que fixam nitrogênio solucionam esse problema por meio de vários caminhos. Algumas existem apenas anaerobicamente ou reprimem a síntese da nitrogenase quando o oxigênio está presente. Algumas bactérias aeróbicas, como a *Azotobacter vinelandii*, desacoplam parcialmente o transporte de elétrons da síntese de ATP, de tal forma que o oxigênio é rapidamente queimado à medida que penetra na célula (veja Adendo 19-1). As culturas dessas bactérias, quando estão fixando nitrogênio, chegam a se aquecer como resultado dos seus esforços para remover o oxigênio. Algumas espécies de cianobactérias fixadoras de nitrogênio empregam outro tipo de solução. Uma de cada nove células diferencia-se em um heterocisto, uma célula especializada para a fixação do nitrogênio, com paredes grossas o suficiente para impedir a entrada de oxigênio.

O relacionamento simbiótico entre as plantas leguminosas e as bactérias fixadoras de nitrogênio presentes nos nódulos das suas raízes (Fig. 22-4) resolve tanto o problema de necessidade de energia para suas reações quanto o da labilidade das enzimas diante do oxigênio. Provavelmente, a energia necessária para a fixação do nitrogênio foi a força evolucionária condicionadora dessa associação de vegetais com bactérias. A bactéria nos nódulos da raiz tem acesso a um grande reservatório de energia na forma de abundantes quantidades de carboidratos e ciclo intermediário do ácido cítrico sintetizados pela planta. Com essa fonte de energia disponível e nas condições geralmente encontradas no solo, a bactéria, nos nódulos da raiz, pode fixar centenas de vezes mais nitrogênio do que os seus parentes de vida livre. Para resolver o problema da toxicidade do oxigênio, as bactérias, nos nódulos da raiz, são banhadas em uma solução de uma proteína fixadora de oxigênio chamada de **leg-hemoglobina.** Essa proteína é produzida pela planta (embora o heme possa ser fornecido pela bactéria). A leg-hemoglobina capta todo o oxigênio disponível e o libera para o sistema de transferência de elétrons da bactéria, dessa maneira, ele não interfere na fixação do nitrogênio. A eficiência da simbiose entre plantas e bactérias fica evidente pelo



(a) (b)

Figura 22-4 – Nódulos de fixação do nitrogênio (**a**) As raízes de uma planta leguminosa, o capim pé-de-galinha. (**b**) Eletrofotomicrografia colorida de forma artificial de uma secção fina através de um nódulo da raiz da ervilha. As bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio bacteróides (em vermelho) vivem no interior das células do nódulo, envoltas pela membrana peribacteróide (azul). Os bacteróides produzem a enzima nitrogenase, que converte o nitrogênio atmosférico (N_2) em íon amônio (NH_4^+); sem os bacteróides, a planta é incapaz de utilizar o N_2. As células das raízes fornecem alguns fatores essenciais para a fixação do nitrogênio, particularmente a leg-hemoglobina. Essa proteína heme tem uma afinidade muito alta pelo oxigênio que é um inibidor muito forte da nitrogenase. (O núcleo da célula está mostrado em amarelo-esverdeado. A célula vegetal infectada também contém outras organelas, que não são visíveis nesta microfotografia e que são normalmente encontradas em células vegetais.)

enriquecimento em nitrogênio dos solos em que são cultivadas as plantas leguminosas. Esse enriquecimento é a base do método de rotação de culturas empregado por muitos agricultores, nele, as plantações de não-leguminosas (como o milho) que extraem o nitrogênio fixado no solo são alternadas a cada poucos anos com plantações de leguminosas, como alfafa, ervilhas e trevos.

A fixação do nitrogênio é o objeto de intensos estudos devido à sua imensa importância prática. O custo de produção da amônia industrial para uso em fertilizantes aumenta paralelamente ao aumento do preço da energia necessária ao processo, isso tem levado a grandes esforços para desenvolver um organismo recombinante ou transgênico que possa fixar o nitrogênio. Técnicas do DNA recombinante estão sendo empregadas para transferir o DNA que codifica a nitrogenase e enzimas relacionadas para plantas e bactérias não-fixadoras de nitrogênio (Capítulo 29). O sucesso desses esforços dependerá da superação dos problemas gerados pela toxicidade do oxigênio em qualquer célula que produza a nitrogenase.

A amônia é incorporada nas biomoléculas por meio da glutamina e do glutamato

O nitrogênio reduzido na forma de NH_4^+ é assimilado primeiro em aminoácidos e depois em outras biomoléculas que contêm nitrogênio. Dois aminoácidos, **glutamato** e **glutamina**, fornecem o ponto crítico de entrada. Lembre-se de que esses mesmos aminoácidos desempenham papéis centrais na oxidação dos aminoácidos (Capítulo 18). O grupo amino da maioria dos outros aminoácidos é derivado do grupo amino do glutamato por meio das reações de transaminação (o inverso da reação mostrada na Fig. 18-4). O nitrogênio amida da glutamina é a fonte dos grupos amino em uma grande variedade de processos biossintéticos. A maioria dos tipos celulares e fluidos intercelulares nos organismos superiores ou um ou ambos desses dois aminoácidos estão presentes em concentração elevada, algumas vezes, uma ordem de magnitude ou mais que aquelas dos outros aminoácidos. Na *E. coli*, a necessidade de glutamato é tão grande que ele é um dos solutos primários dessa célula. A sua concentração é variada, embora regulada, não apenas em resposta às necessidades de nitrogênio, mas também para manter o interior da célula em equilíbrio osmótico com o meio externo.

As vias biossintéticas até glutamato e glutamina são simples e parecem ser similares em todas as formas de vida. A via mais importante para a assimilação de NH_4^+ no glutamato requer duas reações. Primeiro, o glutamato e o NH_4^+ reagem para formar glutamina pela ação da **glutamina sintetase**. Lembre-se de que essa reação ocorre em dois passos, com o γ-glutamil fosfato ligado à enzima, funcionando como um intermediário (pág. 492):

$$\text{(1)}\quad \text{Glutamato} + \text{ATP} \longrightarrow \gamma\text{-glutamil fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{(2)}\quad \gamma\text{-glutamil fosfato} + NH_4^+ \longrightarrow \text{glutamina} + P_i + H^+$$

$$\textit{Soma}\text{: Glutamato} + NH_4^+ + \text{ATP} \longrightarrow \text{glutamina} + \text{ADP} + P_i + H^+ \quad \text{(22-1)}$$

A glutamina sintetase é encontrada em todos os organismos. Além da sua importância para a assimilação de NH_4^+ nas bactérias, esta é uma reação central do metabolismo dos aminoácidos nos mamíferos; ela é a principal via para a conversão da amônia livre, que é muito tóxica, em glutamina, que não sendo tóxica pode ser transportada no sangue (Capítulo 18).

Nas bactérias e vegetais, o glutamato é produzido pela ação da enzima **glutamato sintase**. Essa enzima catalisa a aminação redutiva do α-cetoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico, empregando glutamina como doadora de nitrogênio:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + \text{glutamina} + \text{NADPH} + H^+ \longrightarrow 2\ \text{glutamato} + \text{NADP}^+ \quad \text{(22-2)}$$

A reação líquida final glutamina sintetase e glutamato sintase (reações 22-1 e 22-2) é:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + NH_4^+ + \text{NADPH} + \text{ATP} \longrightarrow \text{L-glutamato} + \text{NADP}^+ + \text{ADP} + P_i$$

A glutamato sintase nunca foi encontrada nos animais, e os altos níveis de glutamato são mantidos por processos, como a transaminação do α-cetoglutarato, durante o catabolismo dos aminoácidos.

O glutamato também pode ser formado por uma outra via, embora menor. A reação entre o α-cetoglutarato e o NH_4^+ para formar glutamato em um único passo pela ação da L-glutamato desidrogenase, presente em todos os organismos. A força redutora necessária é fornecida pelo NADPH:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + NH_4^+ + \text{NADPH} \longrightarrow \text{L-glutamato} + \text{NADP}^+ + H_2O$$

Encontramos esta reação no catabolismo dos aminoácidos (Capítulo 18). Nas células eucariotas, a L-glutamato desidrogenase está localizada na matriz mitocondrial. O equilíbrio para a reação favorece os reagentes e o K_m para o NH_4^+ (~1mM) é tão alto que essa reação provavelmente faz apenas uma modesta contribuição para a assimilação do NH_4^+ (lembre-se de que a reação invertida da glutamato desidrogenase (Fig. 18-9) é uma fonte primária de NH_4^+ destinado ao ciclo da uréia). As bactérias do solo e as plantas, de forma geral, dependem da via de duas enzimas descritas anteriormente (Equações 22-1 e 22-2). Concentrações de NH_4^+ suficientemente altas para possibilitar que a reação da glutamato desidrogenase possa fazer uma contribuição significativa para os níveis de glutamato somente ocorrem quando a amônia é adicionada ao solo ou quando microrganismos são cultivados em laboratório na presença de altas concentrações dessa substância.

A glutamina sintetase é um ponto primário de regulação do metabolismo do nitrogênio

A atividade da glutamina sintetase é regulada em todos os organismos — o que não é surpreendente se considerarmos seu papel importante e central como ponto de entrada no metabolismo do nitrogênio reduzido. Em bactérias entéricas, como a *Escherichia coli*, essa regulação é de complexidade incomum. Ela está sujeita aos dois tipos de regulação enzimática: alostérica e por modificação covalente. A enzima é constituída por 12 subunidades idênticas de M_r 50.000 (Fig. 22-5) e é regulada de duas formas: alostérica e por modificação covalente. Ao menos seis produtos finais do metabolismo da glutamina, além da alanina e da glicina, são inibidores alostéricos da enzima (Fig. 22-6), e cada subunidade tem sítios de ligação para todos os oito inibidores, além de um sítio ativo para a catálise. Sozinhos, cada um dos inibidores fornece apenas inibição parcial. Entretanto, os efeitos dos diferentes inibidores são mais do que simplesmente aditivos, todos os oito juntos virtualmente desligam a enzima. Esse mecanismo de controle provê um ajuste contínuo do suprimento adequado de glutamina para atender a todas as necessidades metabólicas dela.

Superposta à regulação alostérica está a inibição por adenilação (adição de AMP) da tirosina[397] (Fig. 22-7), localizada próximo ao sítio ativo da enzima. Essa modificação covalente aumenta a sensibilidade da enzima para os inibidores alostéricos e a sua atividade decresce à medida que cada uma de suas 12 subunidades são adeniladas. Tanto a adenilação quanto a desadenilação são promovidas pela enzima **adenililtransferase**, que toma parte em uma cascata enzimática complexa que responde aos níveis de glutamina, α-cetoglutarato, ATP e P_i. A atividade da adenililtransferase é modulada pela ligação a uma proteína reguladora chamada P_{II}. O efeito de P_{II}, por sua vez, é regulado por modificação cova-

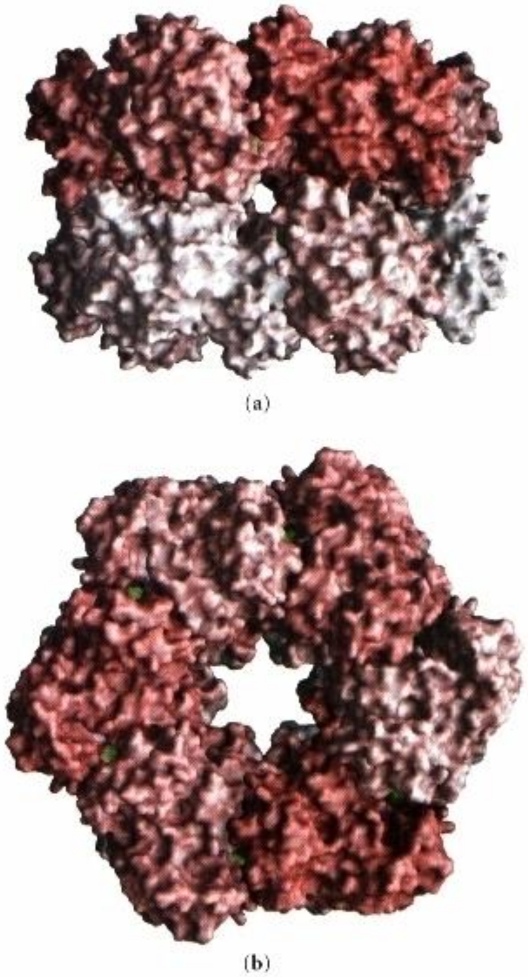


Figura 22-5 – Estrutura em subunidades da glutamina sintetase como determinada por difração de raios X. (**a**) Vista lateral. As 12 subunidades são idênticas, elas estão coloridas de forma diferente para ilustrar o empacotamento e a localização. (**b**) A visão da face superior da molécula mostra os sítios ativos (em verde).

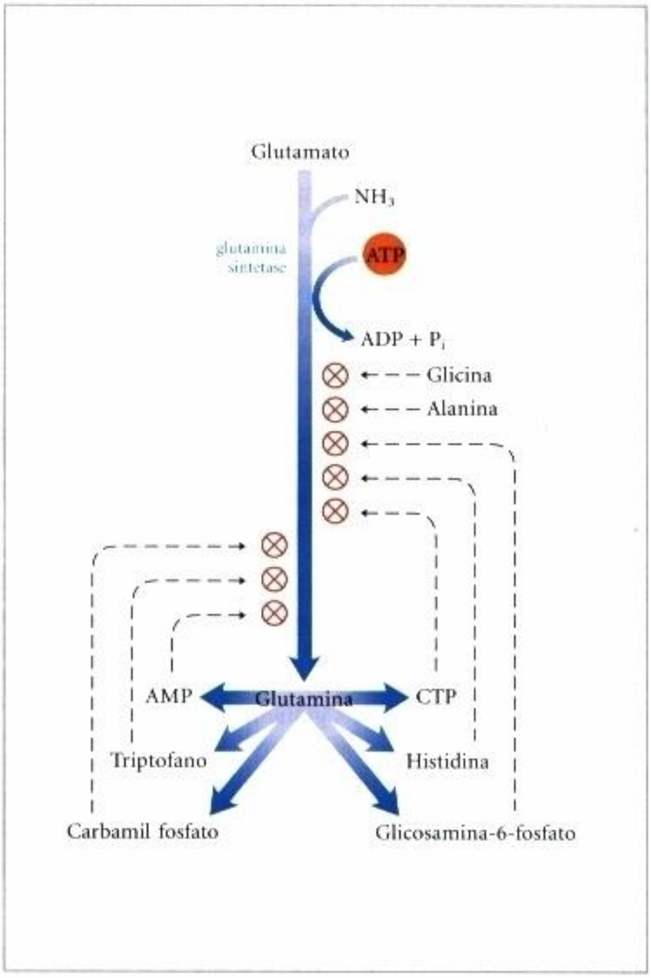


Figura 22-6 – Regulação alostérica da glutamina sintetase. A enzima sofre regulação cumulativa por seis produtos finais do metabolismo da glutamina. A alanina e a glicina provavelmente servem como indicadores do estado geral do metabolismo celular de aminoácidos.

lente (uridilação), novamente em um resíduo de tirosina. O complexo da adenililtransferase com P_{II} (P_{II}-UMP) estimula a desadenilação, enquanto um mesmo complexo com a P_{II} desuridilada estimula a adenilação da glutamina sintetase. Tanto a uridilação quanto a desuridilação de P_{II} são realizadas por uma única enzima, **uridililtransferase**. A uridilação é estimulada por α-cetoglutarato e ATP para P_{II}, mas inibida pela ligação com glutamina e P_i.

O resultado final desse mecanismo complexo de regulação é um decréscimo da atividade da glutamina sintetase, quando os níveis de glutamina são altos, e um aumento dessa atividade, quando os níveis de glutamina são baixos e estão disponíveis os substratos α-cetoglutarato e ATP.

Várias classes de reações desempenham papéis especiais na biossíntese dos aminoácidos e dos nucleotídeos

As vias descritas neste capítulo oferecem exemplos de uma grande variedade de interessantes rearranjos químicos. Vários deles são recorrentes e merecem nota especial antes de discutirmos as vias em si mesmas. Estes são: (1) as reações de transaminação e outros rearranjos promovidos por enzimas que contêm piridoxal fosfato; (2) a transferência de grupos monocarbônicos, usando ou tetraidrofolato ou S-adenosilmetionina como co-fator; e (3) a transferência de grupos amino derivados do nitrogênio amida da glutamina.

O piridoxal fosfato (PLP), tetraidrofolato (H_4 folato) e S-adenosilmetionina (adoMet) são descritos em detalhes no Capítulo 18; veja as Figuras 18-6, 18-16 e 18-17, respectivamente. Agora, estudaremos apenas a transferência do grupo amino envolvendo o nitrogênio amida da glutamina.

Existe mais de uma dúzia de reações biossintéticas conhecidas, nas quais a glutamina é a principal fonte fisiológica do grupo amino, e a maioria destas aparece nas vias descritas neste capítulo. Como uma classe, as enzimas que catalisam essas reações são chamadas de **glutamina amidotransferases** e todas têm dois domínios estruturais. Um domínio liga a glutamina e o outro liga o segundo substrato, que funciona como um receptor do grupo amino (Fig. 22-8). Acredita-se que, na reação, um resíduo de cisteína no domínio de ligação da glutamina age como um nucleofílico, quebrando a ligação amida da glutamina e formando um intermediário glutamil-enzima covalente. A NH_3, produzida nessa reação, permanece no sítio ativo e reage com o segundo substrato para formar o produto aminado. O intermediário covalente é hidrolisado para formar a enzima livre e o glutamato. Se o segundo substrato precisa ser ativado, o ATP é, em geral, empregado para gerar um intermediário acil-fosfato (representado como R—OX na Fig. 22-8). A glutaminase age de maneira similar, mas usa a H_2O como o segundo substrato e libera NH_4^+ e glutamato (pág. 492).

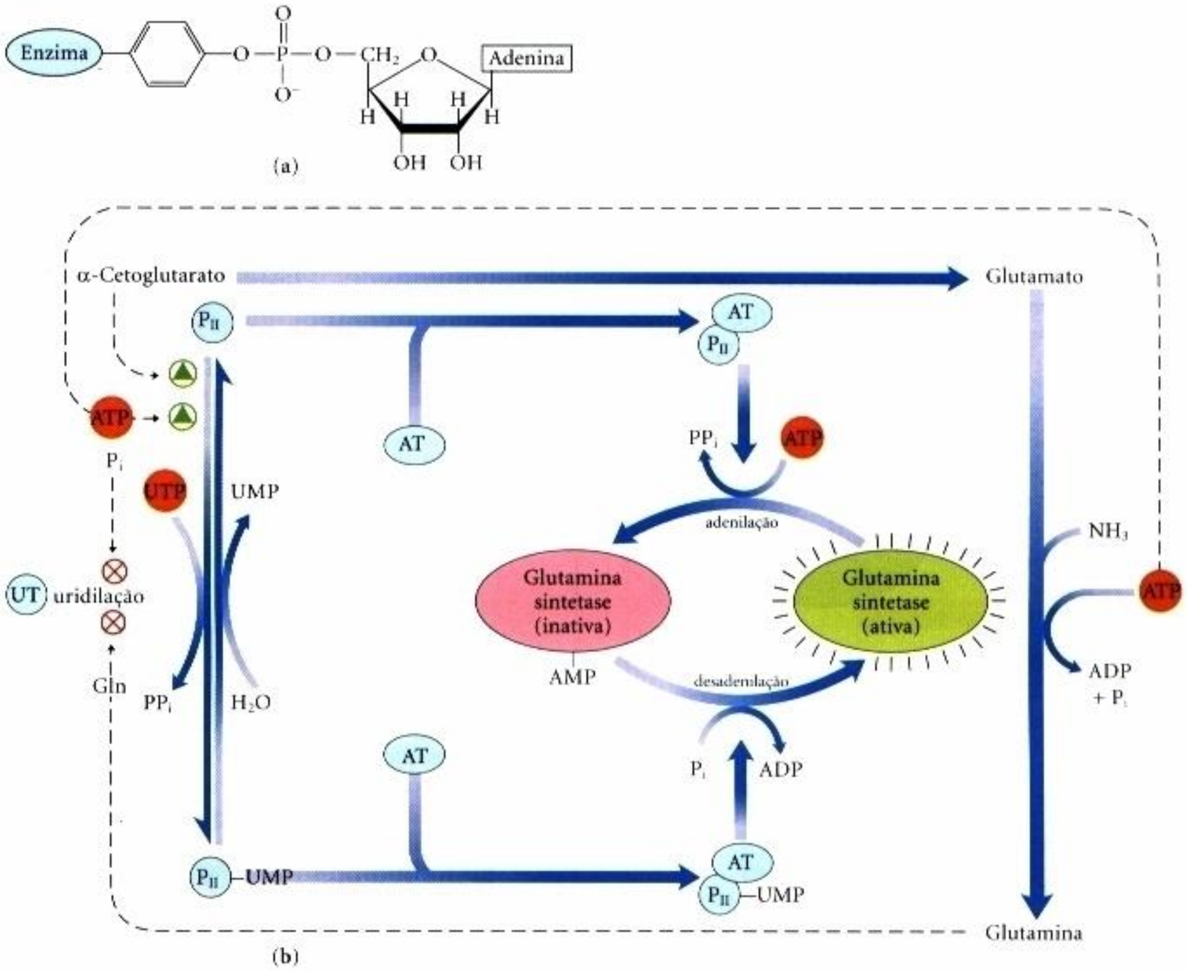

Enzima
O
O
P
O
O⁻
CH₂
O
Adenina
H
H
H
H
OH
OH
(a)
α-Cetoglutarato
Glutamato
PII
AT
PII
ATP
AT
PPi
ATP
Pi
UTP
UMP
adenilação
NH₃
UT
uridilação
Glutamina sintetase (inativa)
Glutamina sintetase (ativa)
ATP
AMP
desadenilação
ADP + Pi
Gln
PPi
H₂O
AT
Pi
ADP
AT
PII–UMP
PII–UMP
Glutamina
(b)

Figura 22-7 – O segundo nível de regulação da glutamina sintetase: regulação covalente. (**a**) Um resíduo de tirosina adenilada. (**b**) Cascata que leva à adenilação (inativação) da glutamina sintetase. AT representa adenililtransferase; UT, uridililtransferase. Os detalhes dessa cascata são discutidos no texto.

Biossíntese dos Aminoácidos

Todos os aminoácidos são derivados de intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico ou da via das pentoses fosfato (Fig. 22-9). O nitrogênio entra nessas vias por meio do glutamato e da glutamina. Algumas vias são simples, outras não. Dez dos aminoácidos estão distantes dos seus precursores iniciais por apenas um ou poucos passos enzimáticos. Para os demais, como os aminoácidos aromáticos, as vias biossintéticas são mais complexas.

Os diferentes organismos variam muito em sua habilidade para sintetizar os 20 aminoácidos ditos padrão por serem os que comparecem nas proteínas. Enquanto a maioria das bactérias e dos vegetais pode sintetizar todos os 20, os mamíferos podem sintetizar apenas perto da metade deles, geralmente sintetizados por vias mais simples. Estes são chamados de **aminoácidos não-essenciais** para deixar evidente o fato de que não é necessário que estejam presentes na alimentação (veja Tabela 18-1). Os demais, os **aminoácidos essenciais**, precisam ser obtidos, obrigatoriamente, dos alimentos. Enquanto não indicado ao contrário, as vias apresentadas a seguir são aquelas que ocorrem em bactérias.

Uma maneira útil de organizar as vias biossintéticas dos aminoácidos é agrupá-las em seis famílias correspondentes aos precursores metabólicos de cada aminoácido (Tabela 22-1), usaremos a maneira empregada nas descrições detalhadas dessas vias apresentadas a seguir.

Tabela 22-1 – Famílias biossintéticas dos aminoácidos agrupados segundo o precursor metabólico

α-Cetoglutarato
Glutamato
Glutamina
Prolina
Arginina[*]

3-Fosfoglicerato
Serina
Glicina
Cisteína

Oxaloacetato
Aspartato
Asparagina
Metionina[†]
Treonina[†]
Lisina[†]
Isoleucina[†]

Piruvato
Alanina
Valina[†]
Leucina[†]

Fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato
Triptofano[†]
Fenilalanina[†]
Tirosina[‡]

Ribose-5-fosfato
Histidina[†]

[*] Essencial em animais jovens.
[†] Aminoácidos essenciais.
[‡] Derivada da fenilalanina nos mamíferos.

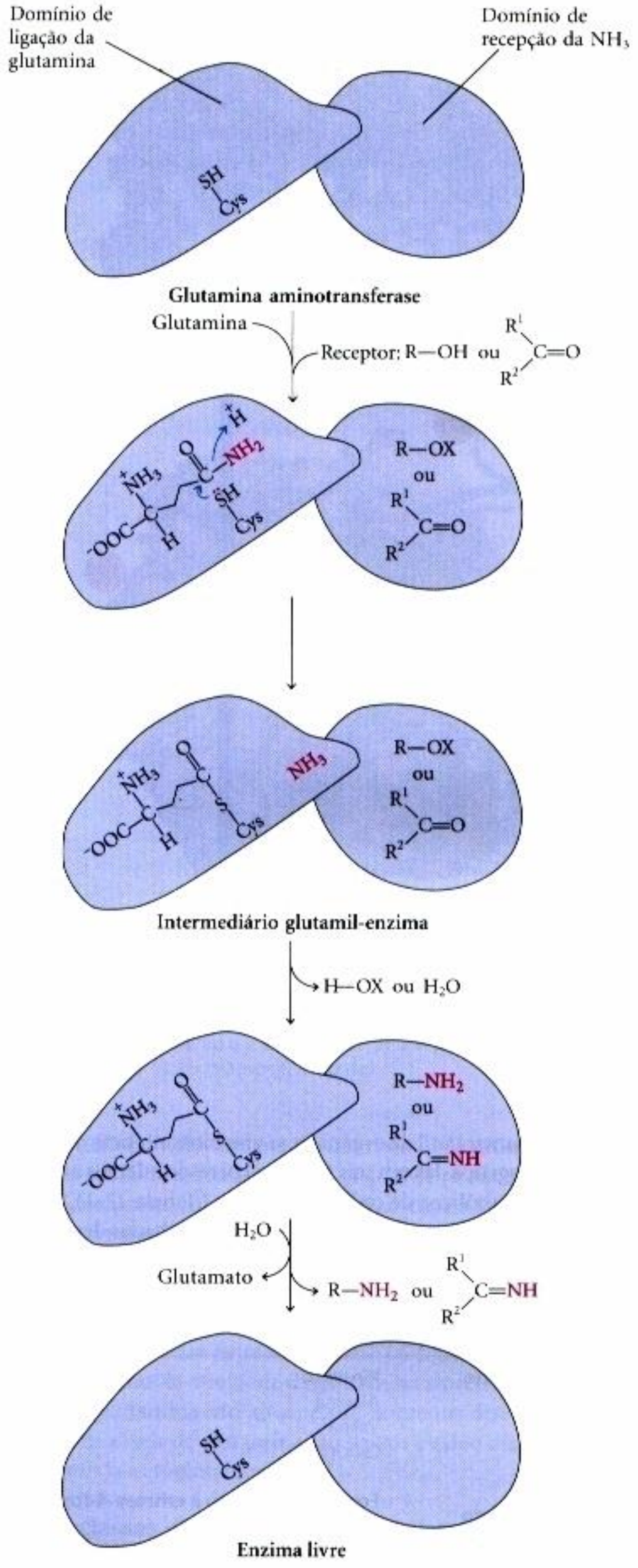

Domínio de ligação da glutamina
Domínio de recepção da NH₃
SH
Cys
Glutamina aminotransferase
Glutamina
Receptor: R—OH ou R¹ R² C=O
H⁺
NH₂
NH₃⁺
⁻OOC
H
C
SH
Cys
R—OX
ou
R¹ R² C=O
NH₃
S
Intermediário glutamil-enzima
H—OX ou H₂O
R—NH₂
ou
R¹ R² C=NH
H₂O
Glutamato
R—NH₂ ou R¹ R² C=NH
Enzima livre

Figura 22-8 – Mecanismo proposto para a glutamina amidotransferase. Cada enzima tem dois domínios. O domínio de ligação da glutamina tem um número de elementos estruturais conservados entre muitas dessas enzimas, incluindo um resíduo de cisteína necessário para a atividade. Já o domínio receptor de NH_3 (segundo substrato) sofre variações. O nitrogênio γ-amido da glutamina (vermelho) é liberado na forma de NH_3 em uma reação que, provavelmente, envolve a formação de um intermediário glutamil-enzima. São mostrados os dois tipos de receptores de amino. X representa um grupo ativador, tipicamente um fosfato derivado do ATP que facilita o deslocamento pela NH_3 de um grupo hidroxila do R—OH.

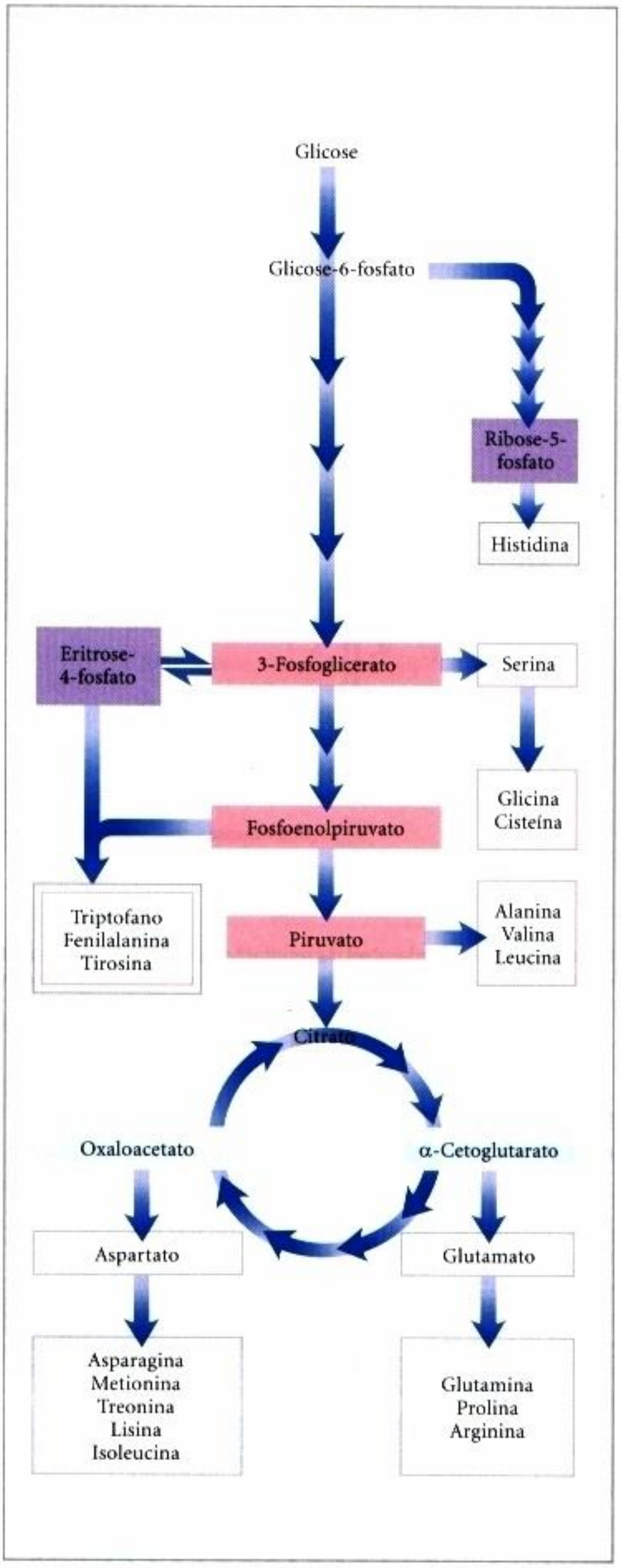
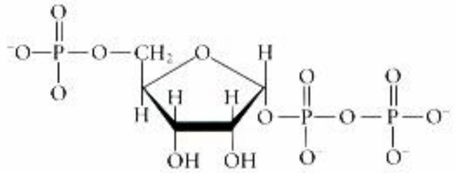

Glicose
Glicose-6-fosfato
Ribose-5-fosfato
Histidina
Eritrose-4-fosfato
3-Fosfoglicerato
Serina
Glicina
Cisteína
Fosfoenolpiruvato
Triptofano
Fenilalanina
Tirosina
Piruvato
Alanina
Valina
Leucina
Citrato
Oxaloacetato
α-Cetoglutarato
Aspartato
Glutamato
Asparagina
Metionina
Treonina
Lisina
Isoleucina
Glutamina
Prolina
Arginina

Figura 22-9 – Visão geral da biossíntese dos aminoácidos. Os precursores dos aminoácidos estão sombreados segundo sua origem, os da glicólise (vermelho), do ciclo do ácido cítrico (azul) e da via das pentoses fosfato (púrpura) e os aminoácidos deles derivados estão em quadros de cores correspondentes. O mesmo artifício, a cor associando os precursores aos produtos finais da via, será empregado nas ilustrações das vias individuais (Figs. 22-10 a 22-20).

Existe, em adição a esses precursores, um intermediário notável que reaparece em muitas vias: é o **5-fosforribosil-1-pirofosfato** (PRPP).



5-Fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP)

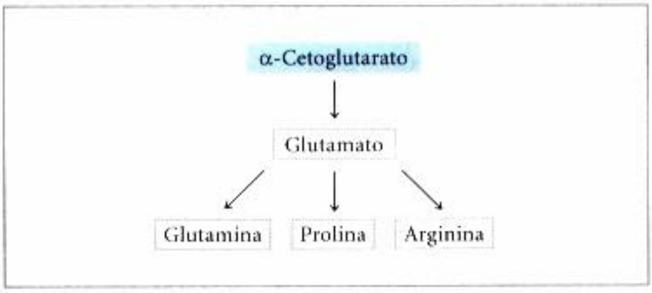
O PRPP é sintetizado da ribose-5-fosfato derivada da via das pentoses fosfato (veja Fig. 15-20), em uma reação catalisada pela **ribose fosfato pirofosfoquinase:**

Ribose-5-fosfato + ATP $\longrightarrow$ 5-fosforribosil-1-pirofosfato + AMP

Essa enzima é regulada alostéricamente por muitas das biomoléculas que têm o PRPP como precursor.

O α-cetoglutarato dá origem ao glutamato, à glutamina, à prolina e à arginina

As biossínteses da **glutamina** e do **glutamato** já foram descritas. A formação da **prolina**, um derivado ciclizado do glutamato, é mostrada na Figura 22-10. No primeiro passo da síntese da prolina, o ATP reage com o grupo γ-carboxila do glutamato para formar um acil-fosfato, este é reduzido pelo NADPH para formar glutamato γ-semi-aldeído. Esse intermediário é ciclizado de forma espontânea e rápida e reduzido para liberar a prolina.

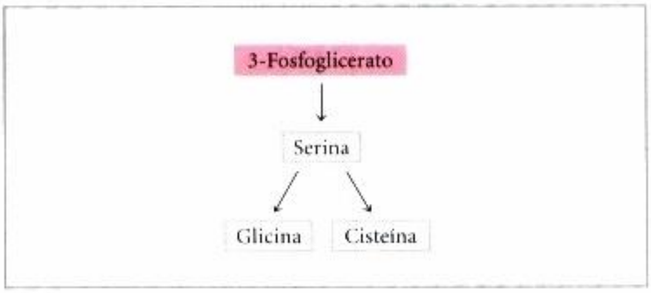


Nos animais, a **arginina** é sintetizada do glutamato via: ornitina e ciclo da uréia (Capítulo 18). A ornitina pode, também, ser sintetizada a partir do glutamato γ-semi-aldeído por transaminação, mas a ciclização do semi-aldeído, que ocorre na via da prolina, é uma reação rápida e espontânea que impede um suprimento suficiente desse intermediário para a síntese de ornitina. As bactérias possuem uma via biossintética para a ornitina (e, portanto, também para a arginina) que, em alguns passos, é paralela à via da prolina, mas inclui dois passos adicionais para bloquear a ciclização espontânea do grupo amino do glutamato γ-semi-aldeído (Fig. 22-10). No início, o grupo α-amino do glutamato é bloqueado por acetilação em uma reação que envolve o acetil-CoA. Depois do passo da transaminação, o grupo acetila é removido para liberar a ornitina.

As vias de síntese da prolina e da arginina são algo diferente nos mamíferos. A prolina pode ser sintetizada pela via mostrada na Figura 22-10, mas ela também é formada da arginina obtida da dieta ou da hidrolise de proteínas tissulares. A arginase, uma enzima do ciclo da uréia, converte arginina em ornitina e em uréia (veja Fig. 18-25). A ornitina é convertida em glutamato γ-semialdeído pela enzima **ornitina δ-aminotransferase** (Fig. 22-11). O semi-aldeído cicliza em Δ^1-pirrolina-5-carboxilato, que é convertido em prolina (Fig. 22-10). A via de síntese da arginina, mostrada na Figura 22-10, está ausente nos mamíferos. Quando a arginina de fontes alimentares ou proveniente da reciclagem de proteínas é insuficiente para a biossíntese geral de proteínas, a ornitina δ-aminotransferase opera na direção da formação de ornitina e esta é convertida em arginina e em citrulina no ciclo da uréia.

Serina, glicina e cisteína são derivadas do 3-fosfoglicerato

A maior via para formação de **serina** é a mesma em todos os organismos (Fig. 22-12). No primeiro passo, o grupo hidroxila do 3-fosfoglicerato é oxidado por uma desidrogenase (usando NAD$^+$) para liberar o 3-fosfoidroxipiruvato. A transaminação com o glutamato libera 3-fosfosserina e esta libera serina por hidrólise pela fosfosserina fosfatase.



O aminoácido serina com três átomos de carbono é o precursor da **glicina** com dois átomos de carbono, essa transformação se faz por meio da remoção de um átomo de carbono pela **serina hidroximetiltransferase** (Fig. 22-12). O tetraidrofolato é o receptor do átomo de carbono β (C-3) da serina formando uma ligação metileno entre N-5 e N-10 do tetraidrofolato para liberar N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato (veja Fig. 18-16). A reação global, que é reversível, também requer piridoxal fosfato.

No fígado dos vertebrados, a glicina pode ser sintetizada por outra rota (o inverso da reação mostrada na Fig. 18-19b), catalisada pela enzima **glicina sintase:**

$$CO_2 + NH_4^+ + NADH + H^+ + N^5,N^{10}\text{-metilenotetraidrofolato} \longrightarrow \text{glicina} + NAD^+ + \text{tetraidrofolato}$$

As bactérias e os vegetais produzem o enxofre reduzido necessário para a síntese da **cisteína** (e da metionina, descrita adiante) a partir de sulfatos encontrados no meio ambiente; a via é mostrada na Figura 22-13. O sulfato é ativado em dois passos e produz 3-fosfoadenosina 5′-fosfossulfato (PAPS), o qual é reduzido a sulfeto pela recepção de oito elétrons. O sulfeto é, então, empregado na síntese da cisteína a partir da serina em uma via de dois passos. Nos mamíferos, a cisteína é sintetizada a partir de dois outros aminoácidos: a metionina fornece o átomo de enxofre, e a serina entra com o esqueleto carbônico. A metionina é primeiro convertida em *S*-adenosilmetionina (veja Fig. 18-17) e esta pode ceder seu grupo metila para qualquer um dos muitos receptores e se transformar em *S*-adenosilomocisteína. Esse produto, desprovido do grupo metila, é hidrolisado para liberar a homocisteína. A seguir, a homocisteína reage com a serina em uma reação catalisada pela **cistationina-β-sintase** para liberar cistationina (Fig. 22-14). No último passo, a **cistationina-γ-liase**, uma enzima que requer PLP, catalisa a remoção de amônia e a clivagem da cistationina para liberar, enfim, a cisteína livre.

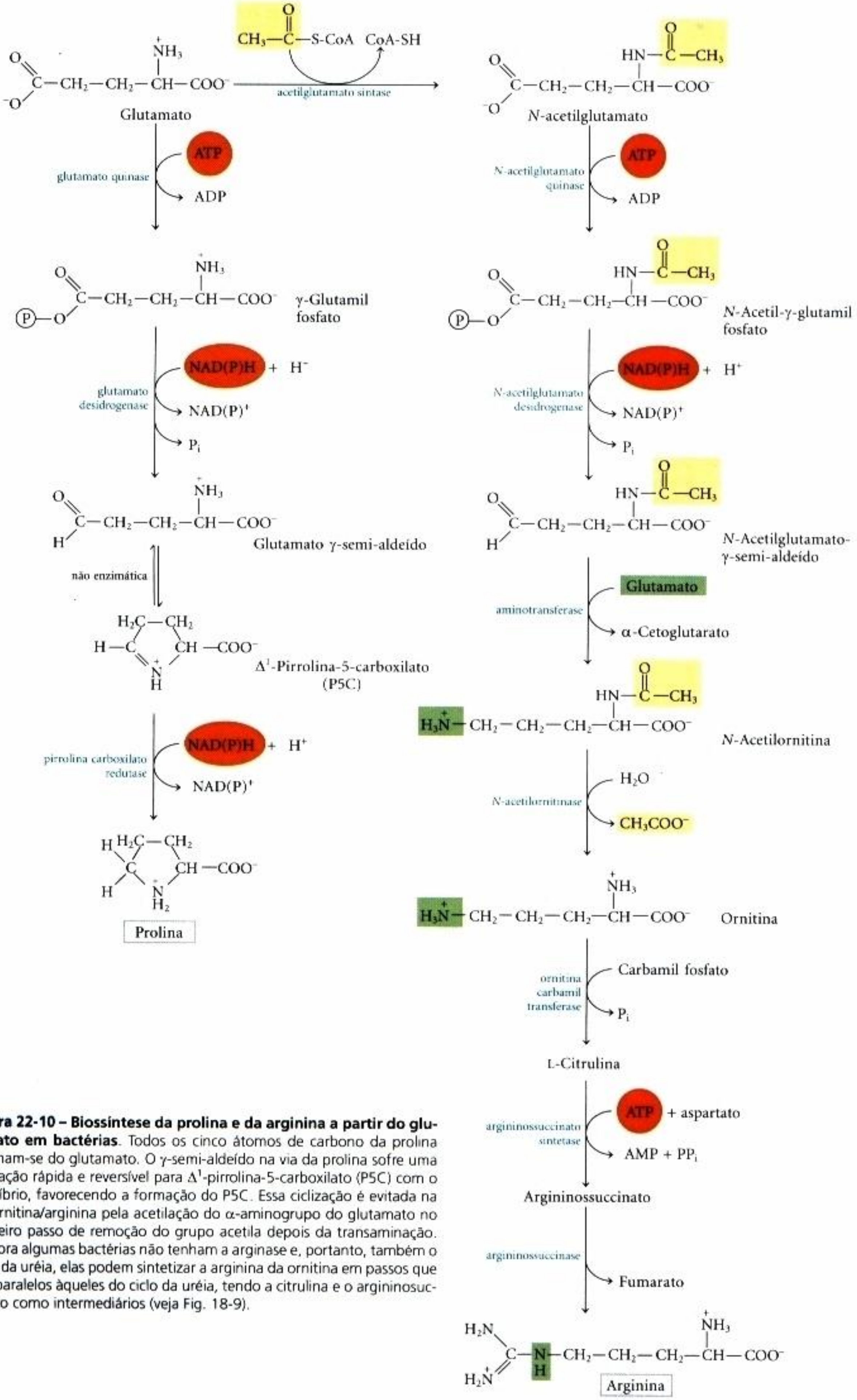

CH₃—C(=O)—S-CoA
CoA-SH
acetilglutamato sintase
Glutamato
N-acetilglutamato
glutamato quinase
ATP
ADP
N-acetilglutamato quinase
γ-Glutamil fosfato
N-Acetil-γ-glutamil fosfato
glutamato desidrogenase
NAD(P)H + H⁺
NAD(P)⁺
Pᵢ
N-acetilglutamato desidrogenase
Glutamato γ-semi-aldeído
N-Acetilglutamato-γ-semi-aldeído
não enzimática
Δ¹-Pirrolina-5-carboxilato (P5C)
aminotransferase
Glutamato
α-Cetoglutarato
N-Acetilornitina
pirrolina carboxilato redutase
Prolina
N-acetilornitinase
H₂O
CH₃COO⁻
Ornitina
ornitina carbamil transferase
Carbamil fosfato
L-Citrulina
argininossuccinato sintetase
ATP + aspartato
AMP + PPᵢ
Argininossuccinato
argininossuccinase
Fumarato
Arginina

Figura 22-10 – Biossíntese da prolina e da arginina a partir do glutamato em bactérias. Todos os cinco átomos de carbono da prolina originam-se do glutamato. O γ-semi-aldeído na via da prolina sofre uma ciclização rápida e reversível para Δ¹-pirrolina-5-carboxilato (P5C) com o equilíbrio, favorecendo a formação do P5C. Essa ciclização é evitada na via ornitina/arginina pela acetilação do α-aminogrupo do glutamato no primeiro passo de remoção do grupo acetila depois da transaminação. Embora algumas bactérias não tenham a arginase e, portanto, também o ciclo da uréia, elas podem sintetizar a arginina da ornitina em passos que são paralelos àqueles do ciclo da uréia, tendo a citrulina e o argininosuccinato como intermediários (veja Fig. 18-9).

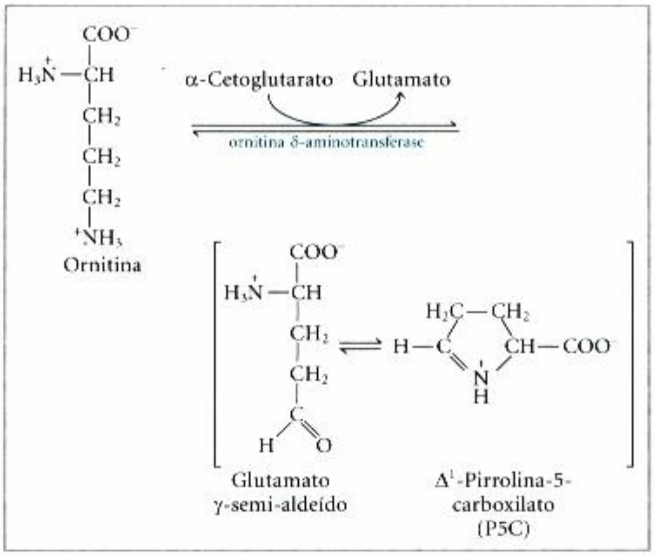

Ornitina
α-Cetoglutarato
Glutamato
ornitina δ-aminotransferase
Glutamato γ-semi-aldeído
Δ¹-Pirrolina-5-carboxilato (P5C)

Figura 22-11 – A reação da ornitina δ-aminotransferase: uma passo na via da prolina nos mamíferos. Essa enzima é encontrada na matriz mitocondrial da maioria dos tecidos. Embora o equilíbrio favoreça a formação de P5C, a reação reversa é a única via dos mamíferos para a síntese da ornitina (e, assim, também da arginina) quando os níveis de arginina são insuficientes para suprir as necessidades da síntese protéica.

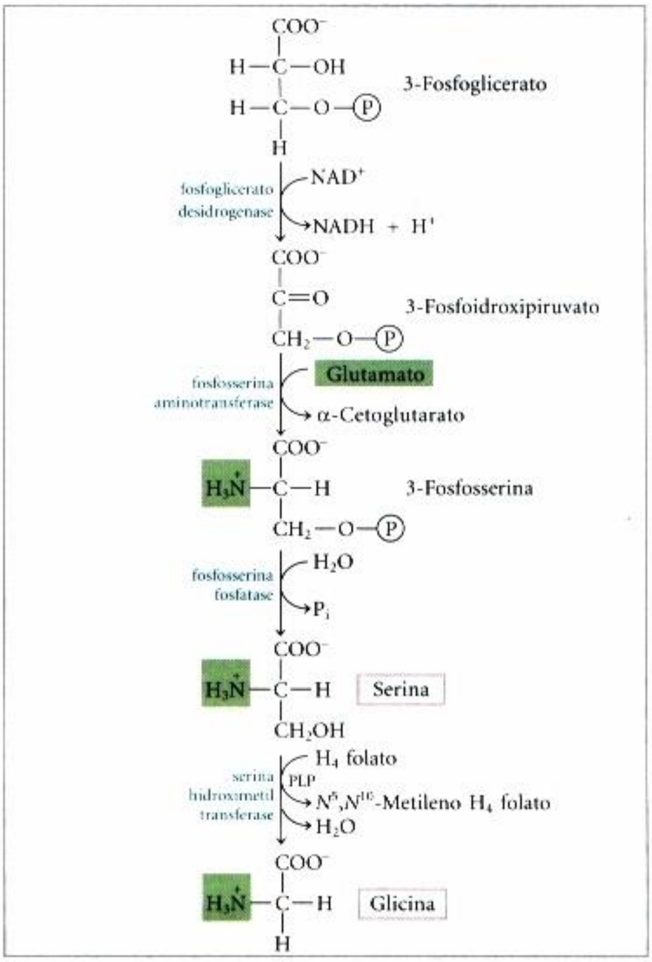

3-Fosfoglicerato
fosfoglicerato desidrogenase
NAD⁺
NADH + H⁺
3-Fosfoidroxipiruvato
fosfosserina aminotransferase
Glutamato
α-Cetoglutarato
3-Fosfosserina
fosfosserina fosfatase
H₂O
Pᵢ
Serina
serina hidroximetil transferase
PLP
H₄ folato
N⁵,N¹⁰-Metileno H₄ folato
H₂O
Glicina

Figura 22-12 – Biossíntese da serina a partir do 3-fosfoglicerato e da glicina a partir da serina em todos os organismos. A glicina também é feita a partir de CO_2 e NH_4^+ pela ação da glicina sintase, a qual emprega N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato como doador do grupo metila (veja o texto).

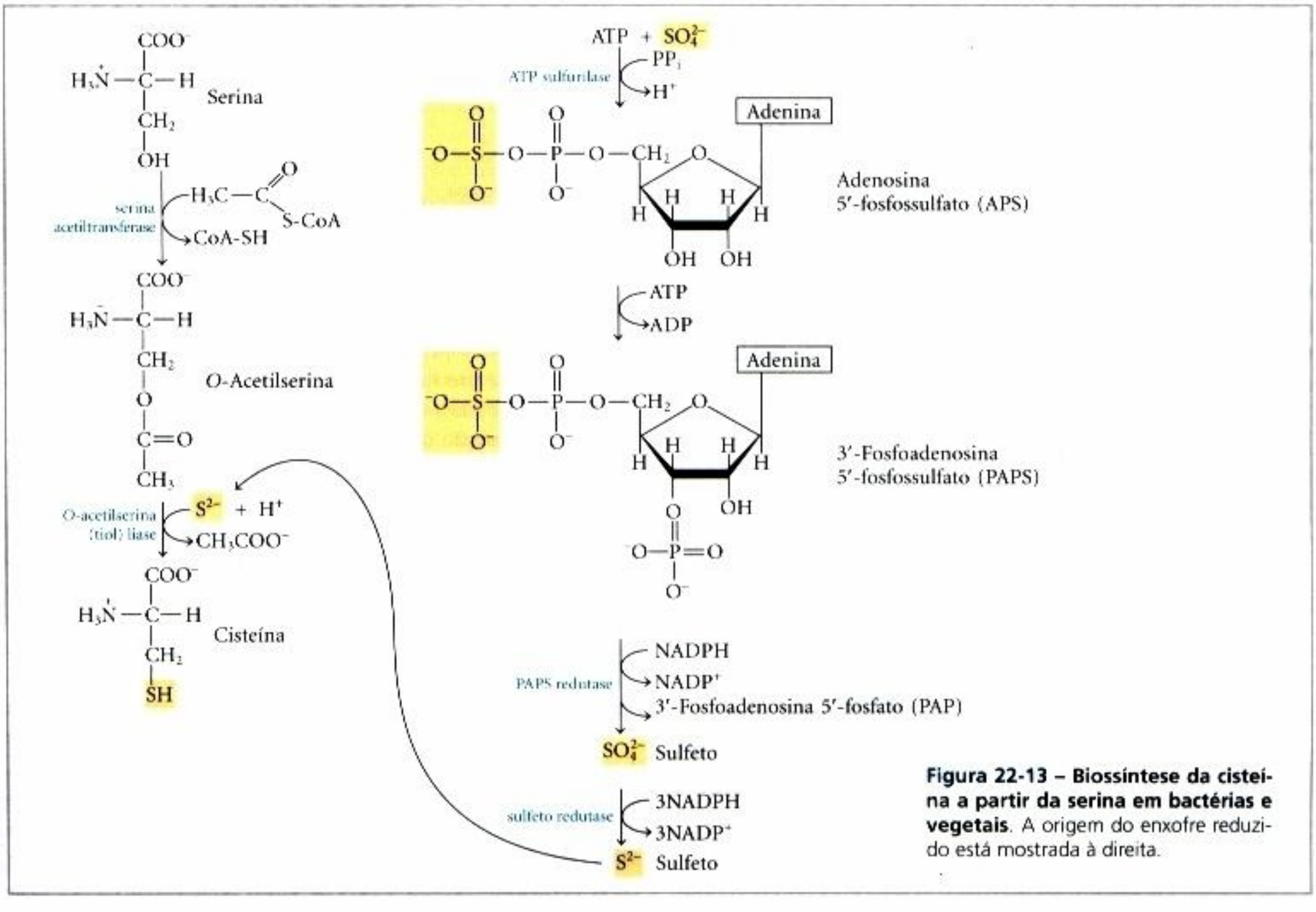

Serina
serina acetiltransferase
CoA-SH
O-Acetilserina
O-acetilserina (tiol) liase
S²⁻ + H⁺
CH₃COO⁻
Cisteína
ATP + SO₄²⁻
ATP sulfurilase
PPᵢ
H⁺
Adenina
Adenosina 5'-fosfossulfato (APS)
ATP
ADP
3'-Fosfoadenosina 5'-fosfossulfato (PAPS)
PAPS redutase
NADPH
NADP⁺
3'-Fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP)
SO₃²⁻ Sulfeto
sulfeto redutase
3NADPH
3NADP⁺
S²⁻ Sulfeto

Figura 22-13 – Biossíntese da cisteína a partir da serina em bactérias e vegetais. A origem do enxofre reduzido está mostrada à direita.

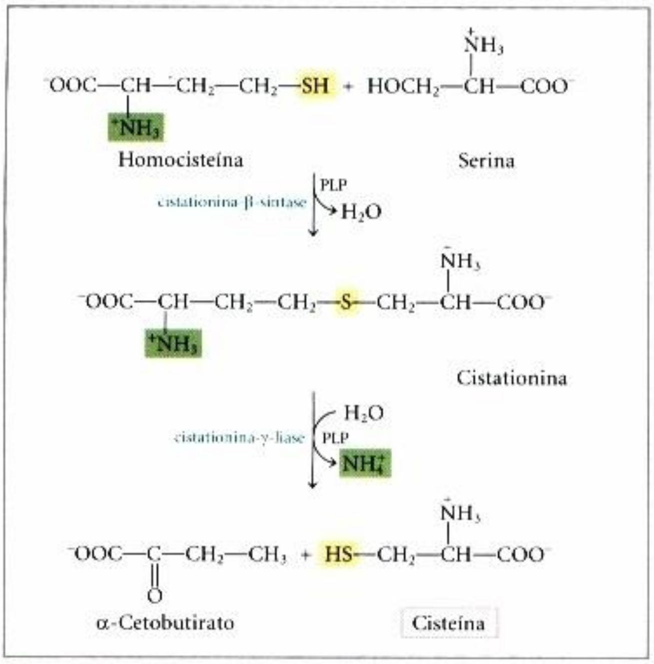


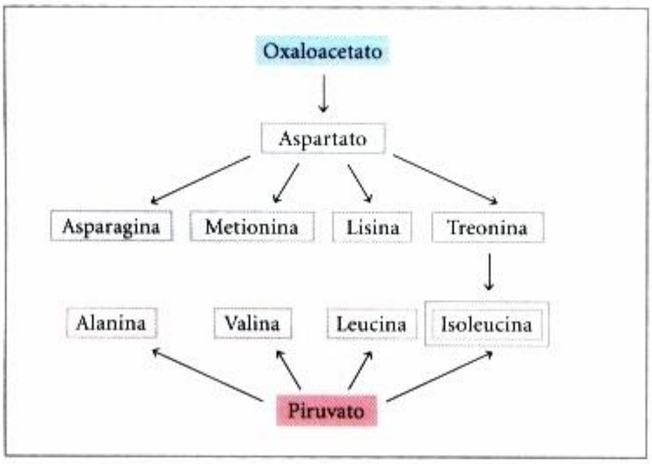
Figura 22-14 – Biossíntese da cisteína a partir de serina e homocisteína nos mamíferos. A homocisteína é formada da metionina, conforme descrito no texto.

Três aminoácidos não-essenciais e seis essenciais são sintetizados do oxaloacetato e do piruvato

A **alanina** e o **aspartato** são sintetizados do piruvato e do oxaloacetato, respectivamente, por transaminação desses ácidos com o glutamato. A **asparagina** é sintetizada por amidação do aspartato, com a glutamina doando o NH_4^+. Esses aminoácidos são não-essenciais e suas vias biossintéticas simples são encontradas em todos os organismos.

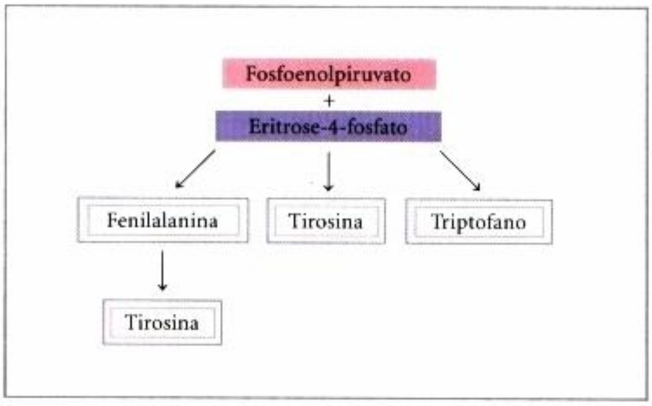
Os aminoácidos metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina e leucina são essenciais. As vias biossintéticas para esses aminoácidos são complexas e interligadas. Em alguns casos, ocorrem diferenças significativas entre as vias respectivas presentes nas bactérias, fungos e vegetais. As vias bacterianas estão resumidas na Figura 22-15.

O aspartato dá origem à **metionina**, à **treonina** e à **lisina**. Pontos de ramificação ocorrem no nível do aspartato-β-semialdeído, um intermediário nas três vias e na altura da homosserina, um precursor da treonina e da metionina. A treonina, por sua vez, é um dos precursores da isoleucina. As vias da **valina** e **isoleucina** compartilham quatro enzimas (Fig. 22-15, passos ⑱ a ㉑). O piruvato dá origem à valina e à isoleucina em vias que começam com a condensação de dois carbonos do piruvato (na forma de hidroxietil tiamina pirofosfato; veja Fig. 15-9) com outra molécula de piruvato (via da valina) ou com o α-cetobutirato (via da isoleucina). O α-cetobutirato é derivado da treonina por meio de uma reação que requer piridoxal fosfato (Fig. 22-15, passo ⑰). Um intermediário na via da valina, o α-cetoisovalerato é o ponto de partida de ramificação para uma via com quatro passos que leva até a **leucina** (passos ㉒ a ㉕).



Corismato é um intermediário-chave na síntese do triptofano, da fenilalanina e da tirosina

Embora o anel benzênico seja muito estável, anéis aromáticos não são facilmente disponíveis no meio ambiente. A via ramificada que leva aos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, que ocorre nas bactérias e vegetais, é a principal rota biológica de formação do anel aromático. Ela ocorre pelo fechamento em anel de um precursor alifático, seguido de adições sucessivas de duplas ligações. Os primeiros quatro passos resultam na produção de shikimato, no qual moléculas de sete carbonos são derivados da eritrose-4-fosfato e do fosfoenolpiruvato (Fig. 22-16). O shikimato é convertido em corismato em três passos subseqüentes que incluem a adição de mais três carbonos de outra molécula de fosfoenolpiruvato. O corismato é o primeiro ponto de ramificação, com um ramo que leva ao triptofano, e o outro, à fenilalanina e à tirosina.



Na ramificação que leva ao **triptofano** (Fig. 22-17), o corismato é convertido primeiro em antranilato. Nessa reação, a glutamina fornece um **nitrogênio** que, em última instância, torna-se parte do anel indol quando completado. O antranilato sofre, então, condensação com o PRPP. O anel indol do triptofano é derivado dos carbonos do anel e do grupo amino do antranilato somados a mais dois carbonos derivados do PRPP. A reação final na seqüência é catalisada pela **triptofano sintase**, uma enzima com uma estrutura em subunidades do tipo $\alpha_2\beta_2$. A enzima pode ser dissociada em duas unidades α e em uma unidade β_2 que catalisa partes diferentes da reação global:

$$\text{Indol-3-glicerol fosfato} \xrightarrow[\text{subunidade } \alpha]{} \text{indol} + \text{gliceraldeído-3-fosfato}$$

$$\text{Indol} + \text{serina} \xrightarrow[\text{subunidade } \beta_2]{} \text{triptofano} + H_2O$$

A segunda parte da reação requer um piridoxal fosfato como co-fator (Fig. 22-18). O indol não é liberado pela enzima, mas se move, através de uma cavidade cheia com o solvente do sítio ativo da subunidade α, para o sítio ativo da subunidade β, onde ele se condensa com uma base de Schiff intermediária, derivada da serina e do PLP. Esse tipo de canalização de intermediários pode ser uma característica da via inteira, que vai do corismato ao triptofano. Os sítios ativos das enzimas catalisando os diferentes passos da via (e, muitas vezes, passos não-seqüenciais) são encontrados em um único polipeptídeo em alguns fungos e bactérias, mas são proteínas separadas em outros. Além disso, a atividade de algumas dessas enzimas requer uma associação não-covalente com outras enzimas da via. Essas observações sugerem que todas são parte de um grande complexo multienzimático em procariotos e eucariotos. Embora esses complexos geralmente não sejam preservados intactos quando as enzimas são isoladas com o emprego de métodos bioquímicos tradicionais, estão se acumulando evidências da existência nas células de complexos multienzimáticos, quer para esta quer para várias outras vias metabólicas (veja pág. 418).

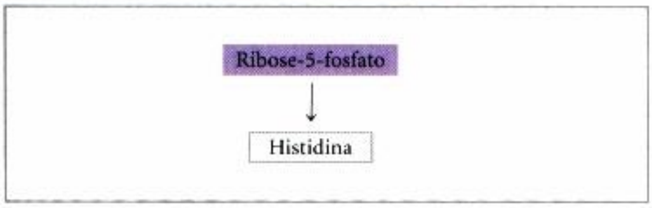
Em vegetais e microrganismos, a **fenilalanina** e a **tirosina** são sintetizadas do corismato por meio de vias mais simples, que empregam o intermediário comum prefenato (Fig. 22-19). Nos dois casos, o passo final é a transaminação com o glutamato.

$$^{-}OOC—CH_2—NH—CH_2—PO_3^{2-}$$

Glifosato

Nos animais, a **tirosina** pode ser feita diretamente da fenilalanina por meio da hidroxilação em C-4 do grupo fenil pela **fenilalanina hidroxilase**, que também participa na degradação da fenilalanina (veja Figs. 18-22 e 18-23). A tirosina é considerada um aminoácido não-essencial apenas porque ela pode ser sintetizada da fenilalanina, que é um aminoácido essencial.

A biossíntese da histidina emprega precursores da biossíntese de purinas



Em todos os vegetais e bactérias, a via biossintética da **histidina** é diferente em vários aspectos das vias correspondentes dos outros aminoácidos. A histidina é derivada de três precursores (Fig. 22-20): o PRPP fornece cinco carbonos, o anel da purina do ATP fornece um nitrogênio e um carbono, e o segundo nitrogênio do anel da histidina vem da glutamina. Os passos decisivos são a condensação do ATP e do PRPP (o N-1 do anel purina torna-se ligado ao C-1 ativado da ribose no PRPP) (passo ① na Fig. 22-20), a abertura do anel de purina que em última instância deixa N-1 e C-2 ligados na ribose (passo ③), e a formação do anel imidazol, em uma reação durante a qual a glutamina entrega um nitrogênio (passo ⑤). O emprego de ATP, como um metabólito, em vez de um co-fator de alta energia, é inusitado, mas não representa um desperdício, porque ele se encaixa na via biossintética da purina. Depois da transferência de N-1 e C-2, o remanescente da molécula do ATP é liberado, o 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR), um intermediário na biossíntese das purinas (veja Fig. 22-31), que pode ser rapidamente reciclado em ATP.

A biossíntese de aminoácidos é regulada de forma alostérica

A maneira mais sensível de controle da biossíntese dos aminoácidos é por meio da inibição por retroalimentação ("feedback") da primeira reação da seqüência biossintética exercida por seu produto final. Em geral, em uma via metabólica, a primeira reação da seqüência é irreversível e catalisada por uma enzima alostérica. Como exemplo, a Figura 22-21 mostra a regulação alostérica da síntese da isoleucina a partir de treonina, já discutida anteriormente (veja Fig. 22-15). O produto final, a isoleucina, é um modulador negativo da primeira reação na seqüência. Nas bactérias, essa modulação alostérica ou não-covalente da síntese de aminoácidos tem grande sensibilidade e apresenta respostas adaptativas em tempos da ordem de minuto.

A regulação alostérica pode ser consideravelmente mais complexa. Um exemplo é o notável conjunto de controles alostéricos exercidos na atividade da glutamina sintetase da *E. coli* (Fig. 22-6). Sabe-se agora que, nessa bactéria, seis produtos do metabolismo da glutamina funcionam como moduladores retroativos negativos da atividade da glutamina sintetase, e os efeitos globais desses e de outros moduladores são mais que simplesmente aditivos. Esse tipo de regulação é denominado **inibição concertada**.

Como os 20 aminoácidos precisam ser produzidos nas proporções corretas para suprir a síntese de proteínas, as células desenvolveram maneiras de controlar não apenas a velocidade de síntese dos aminoácidos individuais, mas também de coordenar a formação de todos eles entre si. Tal coordenação é especialmente bem desenvolvida em células bacterianas em multiplicação rápida.

A Figura 22-22 mostra como as células da *E. coli* coordenam a síntese de lisina, metionina, treonina e isoleucina, todas obtidas a partir do aspartato, deixando evidentes vários tipos de padrões importantes de inibição. O passo do aspartato para aspartil-β-fosfato é catalisado por três isozimas, cada uma delas podendo ser controlada independentemente por diferentes moduladores. Essa **multiplicidade enzimática** impede que um produto final biossintético possa bloquear passos decisivos em uma via quando são necessários outros produtos dela. Os passos de aspartato β-semi-aldeído até homosserina e de treonina até α-cetobutirato (Fig. 22-15) também são catalisados por duas isozimas controladas independentemente. Uma das isozimas para conversão do aspartato em aspartil-β-fosfato pode ser inibida alostericamente por dois moduladores diferentes, lisina e isoleucina, cuja ação é mais que simplesmente aditiva. Esse é outro exemplo de inibição concertada. A seqüência de aspartato até isoleucina mostra inibições múltiplas por retroalimentação negativa superpostas; por exemplo, a isoleucina inibe a conversão de treonina em α-cetobutirato (como descrito acima) e a treonina inibe a sua própria formação em três pontos nos quais comparecem os intermediários: homosserina, aspartato β-semi-aldeído e aspartato (passos ④, ③ e ① na Fig. 22-15). Essa ação geral é chamada de **inibição por retroalimentação seqüencial**.

Moléculas Derivadas dos Aminoácidos

Em adição ao seu papel de unidades fundamentais com as quais são construídas as proteínas, os aminoácidos são também precursores de muitas biomoléculas como hormônios, coenzimas, nucleotídeos, alcalóides, polímeros de paredes celulares, porfirinas, antibióticos, pigmentos e neurotransmissores. Descreveremos agora um grande número de vias metabólicas por meio das quais os aminoácidos atuam como precursores para outras biomoléculas.

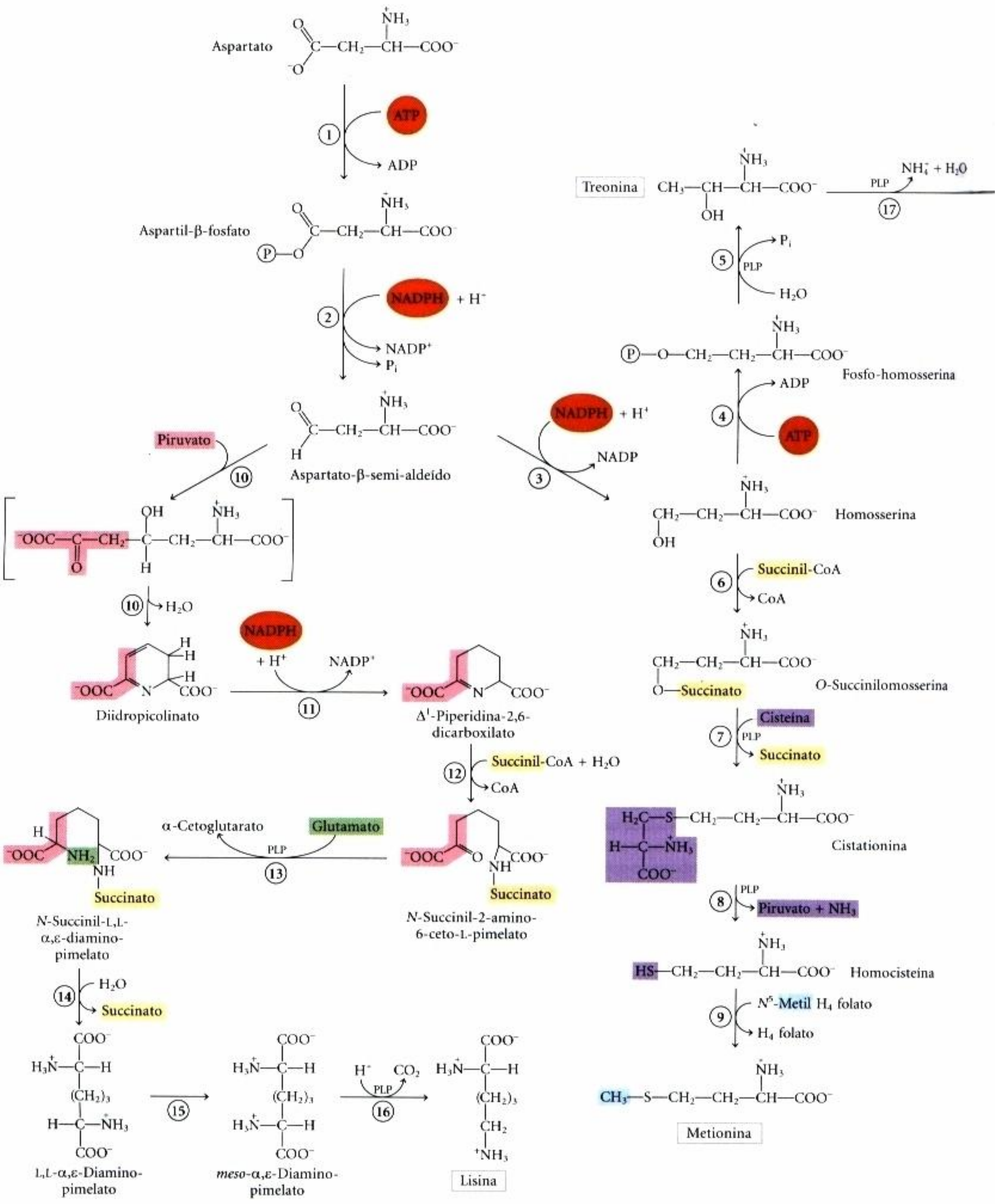
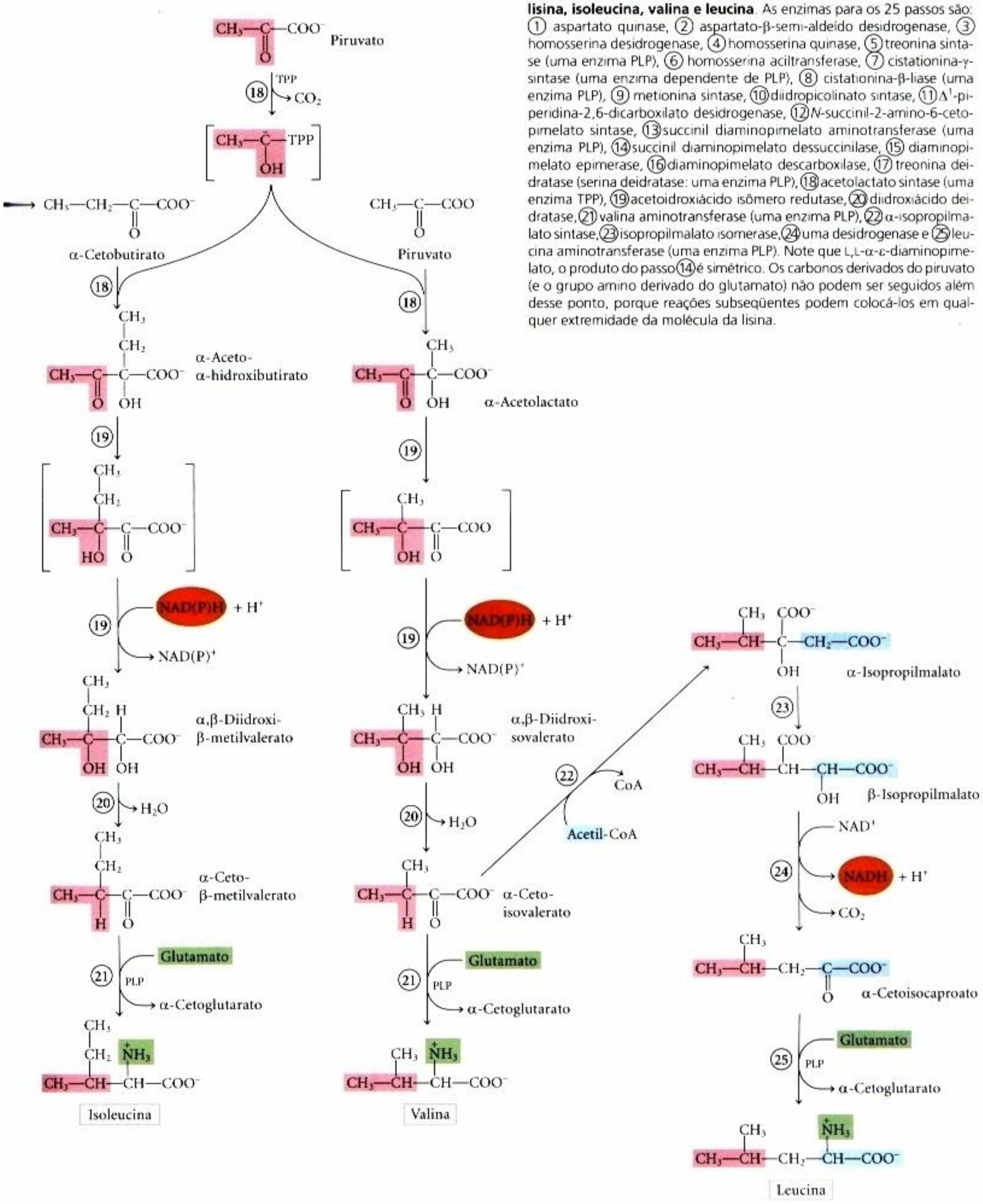

Aspartato
Aspartil-β-fosfato
Aspartato-β-semi-aldeído
ATP
ADP
NADPH
+ H⁺
NADP⁺
Pᵢ
NADP
Piruvato
H₂O
Diidropicolinato
Δ¹-Piperidina-2,6-dicarboxilato
Succinil-CoA + H₂O
CoA
N-Succinil-2-amino-6-ceto-L-pimelato
α-Cetoglutarato
Glutamato
PLP
N-Succinil-L,L-α,ε-diamino-pimelato
Succinato
L,L-α,ε-Diamino-pimelato
meso-α,ε-Diamino-pimelato
H⁺
CO₂
Lisina
Treonina
NH₄⁺ + H₂O
Fosfo-homosserina
Homosserina
Succinil-CoA
O-Succinilomosserina
Cisteína
Cistationina
Piruvato + NH₃
Homocisteína
N⁵-Metil H₄ folato
H₄ folato
Metionina
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

Figura 22-15 – Biossíntese de seis aminoácidos essenciais nas bactérias a partir do oxaloacetato e piruvato: metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina e leucina. As enzimas para os 25 passos são: ① aspartato quinase, ② aspartato-β-semi-aldeído desidrogenase, ③ homosserina desidrogenase, ④ homosserina quinase, ⑤ treonina sintase (uma enzima PLP), ⑥ homosserina aciltransferase, ⑦ cistationina-γ-sintase (uma enzima dependente de PLP), ⑧ cistationina-β-liase (uma enzima PLP), ⑨ metionina sintase, ⑩ diidropicolinato sintase, ⑪ Δ^1-piperidina-2,6-dicarboxilato desidrogenase, ⑫ *N*-succinil-2-amino-6-cetopimelato sintase, ⑬ succinil diaminopimelato aminotransferase (uma enzima PLP), ⑭ succinil diaminopimelato dessuccinilase, ⑮ diaminopimelato epimerase, ⑯ diaminopimelato descarboxilase, ⑰ treonina deidratase (serina deidratase: uma enzima PLP), ⑱ acetolactato sintase (uma enzima TPP), ⑲ acetoidroxiácido isômero redutase, ⑳ diidroxiácido deidratase, ㉑ valina aminotransferase (uma enzima PLP), ㉒ α-isopropilmalato sintase, ㉓ isopropilmalato isomerase, ㉔ uma desidrogenase e ㉕ leucina aminotransferase (uma enzima PLP). Note que L,L-α-ε-diaminopimelato, o produto do passo ⑭ é simétrico. Os carbonos derivados do piruvato (e o grupo amino derivado do glutamato) não podem ser seguidos além desse ponto, porque reações subseqüentes podem colocá-los em qualquer extremidade da molécula da lisina.


Piruvato
⑱
TPP
CO₂
TPP
α-Cetobutirato
Piruvato
⑱
⑱
α-Aceto-α-hidroxibutirato
α-Acetolactato
⑲
⑲
⑲
NAD(P)H + H⁺
NAD(P)⁺
⑲
NAD(P)H + H⁺
NAD(P)⁺
α,β-Diidroxi-β-metilvalerato
α,β-Diidroxi-sovalerato
⑳
H₂O
⑳
H₂O
α-Ceto-β-metilvalerato
α-Ceto-isovalerato
㉑
Glutamato
PLP
α-Cetoglutarato
㉑
Glutamato
PLP
α-Cetoglutarato
Isoleucina
Valina
㉒
CoA
Acetil-CoA
α-Isopropilmalato
㉓
β-Isopropilmalato
㉔
NAD⁺
NADH + H⁺
CO₂
α-Cetoisocaproato
㉕
Glutamato
PLP
α-Cetoglutarato
Leucina

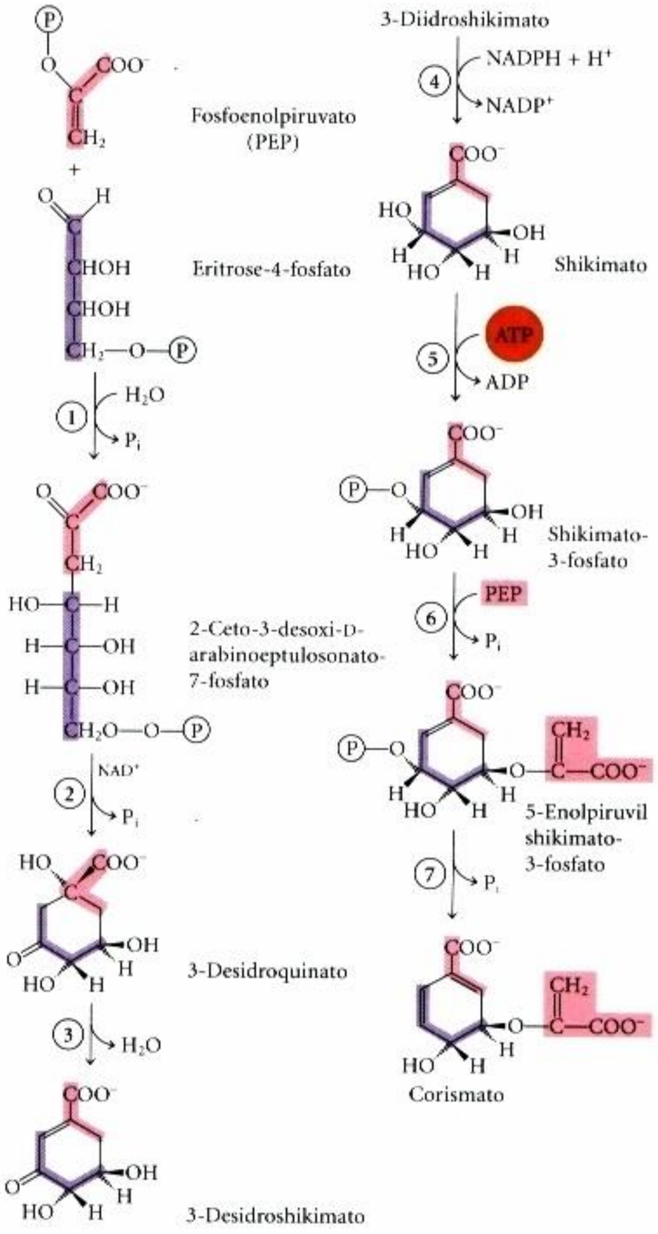

Fosfoenolpiruvato (PEP)
Eritrose-4-fosfato
2-Ceto-3-desoxi-D-arabinoeptulosonato-7-fosfato
3-Desidroquinato
3-Desidroshikimato
3-Diidroshikimato
NADPH + H⁺
NADP⁺
Shikimato
ATP
ADP
Shikimato-3-fosfato
PEP
5-Enolpiruvil shikimato-3-fosfato
Corismato
H₂O
Pᵢ
NAD⁺

Figura 22-16 – Síntese do corismato, um intermediário na síntese dos aminoácidos aromáticos em bactérias e vegetais. Todos os átomos de carbono da molécula do corismato são derivados ou da eritrose-4-fosfato (púrpura) ou do fosfoenolpiruvato (vermelho). As enzimas desta via são: ① 2-ceto-3-desoxi-D-arabinoeptulosonato-7-fosfato sintase, ② desidroquinato sintase, ③ 3-desidroquinato desidratase, ④ shikimato desidrogenase, ⑤ shikimato quinase, ⑥ 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase e ⑦ corismato sintase. Note que o passo ② requer NAD⁺ como um co-fator e que o mesmo NAD⁺ é liberado sem sofrer nenhuma mudança. Ele pode ser reduzido transientemente em NADH durante a reação, para produzir um intermediário oxidado da reação. O passo ⑥ é inibido por glifosato (o ingrediente ativo no herbicida Roundup largamente empregado), um inibidor competitivo da enzima. O herbicida é relativamente não-tóxico para mamíferos, já que eles não possuem essa via. Os nomes químicos quinato, shikimato e corismato são derivados dos nomes de vegetais nos quais se verificou que esses intermediários se acumulam.

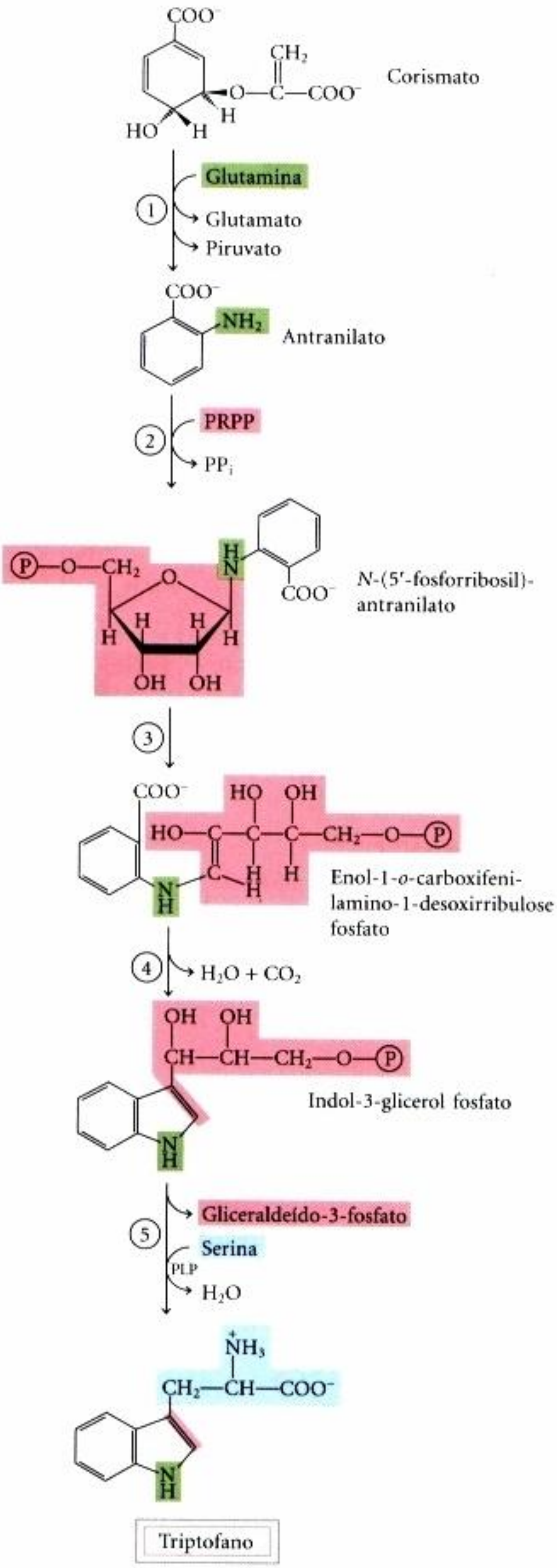

Corismato
Glutamina
Glutamato
Piruvato
Antranilato
PRPP
PPᵢ
N-(5′-fosforribosil)-antranilato
Enol-1-o-carboxifenilamino-1-desoxirribulose fosfato
H₂O + CO₂
Indol-3-glicerol fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
Serina
PLP
H₂O
Triptofano

Figura 22-17 – Biossíntese do triptofano a partir do corismato em bactérias e vegetais. As enzimas são: ① antranilato sintase, ② antranilato fosforribosil transferase, ③ *N*-(5′-fosforribosil)-antranilato isomerase, ④ indol-3-glicerol fosfato sintase e ⑤ triptofano sintase. Na *E. coli*, as enzimas que catalisam os passos ① e ② são subunidades de um único complexo denominado antranilato sintase.

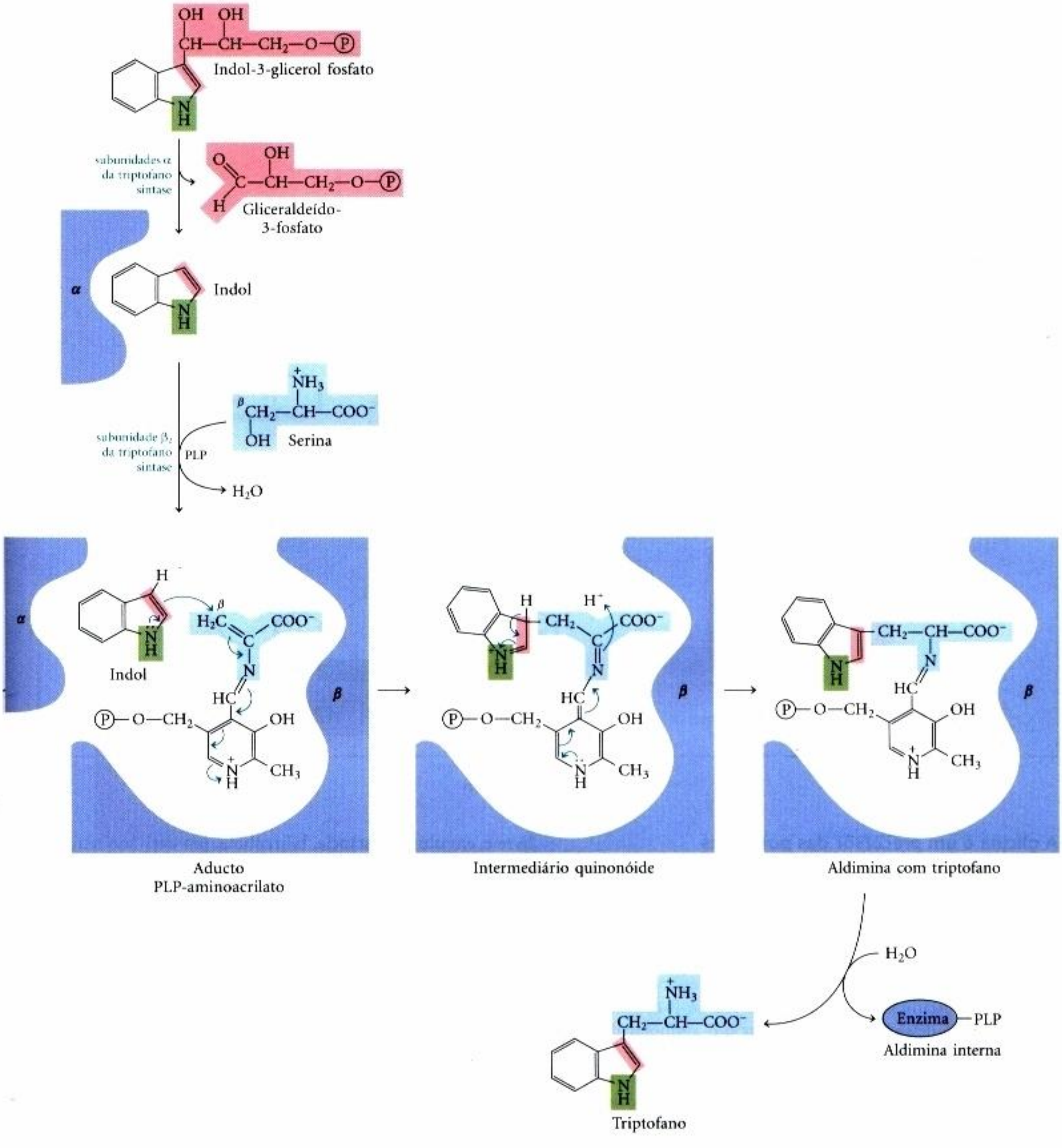

OH OH
CH—CH—CH₂—O—Ⓟ
Indol-3-glicerol fosfato
N
H
subunidades α da triptofano sintase
O
OH
C—CH—CH₂—O—Ⓟ
H
Gliceraldeído-3-fosfato
α
Indol
subunidade β₂ da triptofano sintase
PLP
NH₃
β
CH₂—CH—COO⁻
OH
Serina
H₂O
H
H₂C
COO⁻
C
N
Indol
HC
Ⓟ—O—CH₂
OH
CH₃
β
Aducto PLP-aminoacrilato
H⁺
CH₂
COO⁻
Intermediário quinonóide
CH₂—CH—COO⁻
Aldimina com triptofano
H₂O
NH₃
CH₂—CH—COO⁻
Enzima
PLP
Aldimina interna
Triptofano

Figura 22-18 – A reação da triptofano sintase. Essa enzima catalisa uma reação de muitos passos e com diferentes tipos de rearranjos químicos. Primeiro, há uma clivagem aldol para formar indol e liberar gliceraldeído-3-fosfato; essa reação não requer PLP. O próximo passo é a desidratação da serina para formar um intermediário PLP-aminoacrilato. O indol condensa-se com esse intermediário e o produto é hidrolisado para liberar triptofano. Essa transformação facilitada pelo PLP ocorre no carbono β do aminoácido, em oposição às reações no carbono α descritas na Figura 18-6. O carbono β da serina é ligado ao sistema anel do indol.

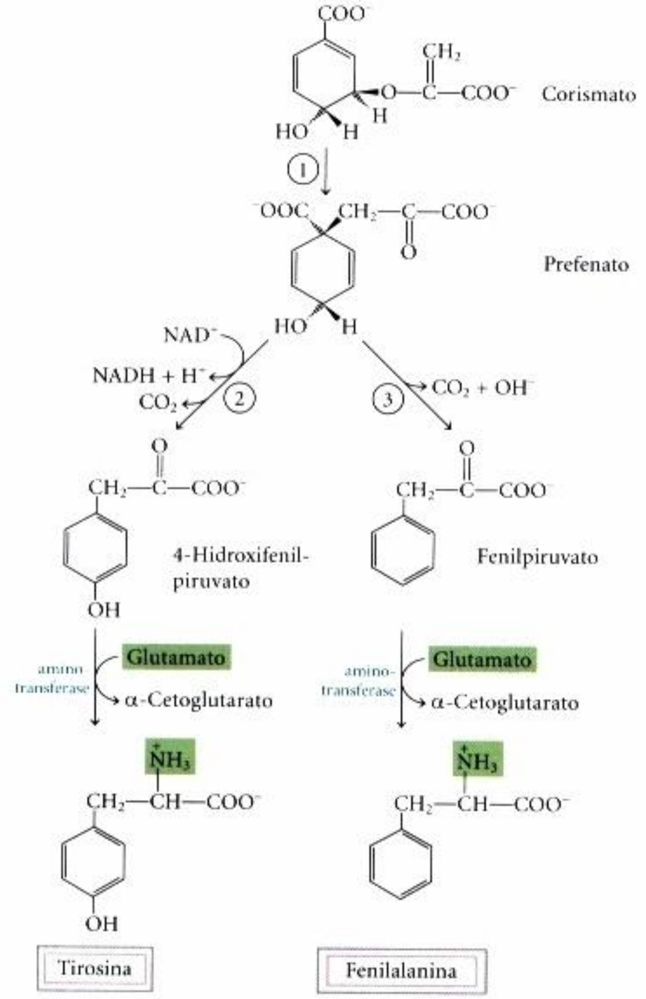


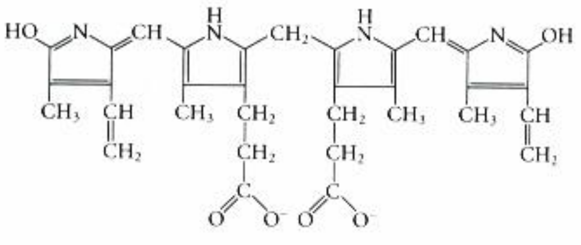
Figura 22-19 – Biossíntese da fenilalanina e da tirosina a partir do corismato em vegetais e bactérias. As enzimas são: ① corismato mutase, ② prefenato desidrogenase e ③ prefenato desidratase. A conversão do corismato em prefenato é um raro exemplo biológico do rearranjo de Claisen.

A glicina é um precursor das porfirinas

A biossíntese das **porfirinas**, nas quais a glicina é um grande precursor, é o nosso primeiro exemplo, devido à importância central do núcleo das porfirinas nas hemoproteínas, como a hemoglobina e os citocromos. As porfirinas são construídas com quatro moléculas do derivado monopirrólico chamado **porfobilinogênio** (Fig. 22-23). Na primeira reação dessa via, a glicina reage com o succinil-CoA para liberar α-amino-β-cetoadipato, o qual é então descarboxilado para dar o δ-aminolevulinato. Duas moléculas de δ-aminolevulinato condensam-se para formar o porfobilinogênio e, por meio de uma série de reações enzimáticas complexas, quatro moléculas de porfobilinogênio juntam-se para formar a **protoporfirina.** O átomo de ferro somente é incorporado depois que a molécula da protoporfirina já foi montada. A biossíntese da porfirina é regulada pela concentração da hemoproteína a ser produzida, tal como a hemoglobina, que pode servir como inibidor retroativo dos primeiros passos na síntese da porfirina. Na espécie humana, defeitos genéticos de determinadas enzimas da via biossintética das porfirinas provocam o acúmulo de seus intermediários. Essas doenças genéticas são conhecidas como **porfirias** (Adendo 22-1).

A degradação do heme forma os pigmentos biliares

A ferroporfirina ou grupo heme da hemoglobina liberada dos eritrócitos que morrem no baço é degradada para liberar Fe^{3+} livre e, em última instância, **bilirrubina,** um derivado tetrapirrólico linear (aberto). A bilirrubina liga-se à albumina sérica e é transportada para o fígado, onde é transformada no pigmento biliar bilirrubina diglicuronídio. Esse composto é hidrossolúvel o suficiente para ser excretado junto a outros componentes da bile no intestino delgado. Quando a função hepática é insuficiente ou ocorre bloqueio da secreção biliar, a bilirrubina extravasa para o sangue, provocando coloração amarelada da pele e dos glóbulos oculares, uma condição chamada icterícia. A determinação da concentração da bilirrubina no sangue, em casos de icterícia, é útil no diagnóstico de doenças hepáticas subclínicas.



Bilirrubina

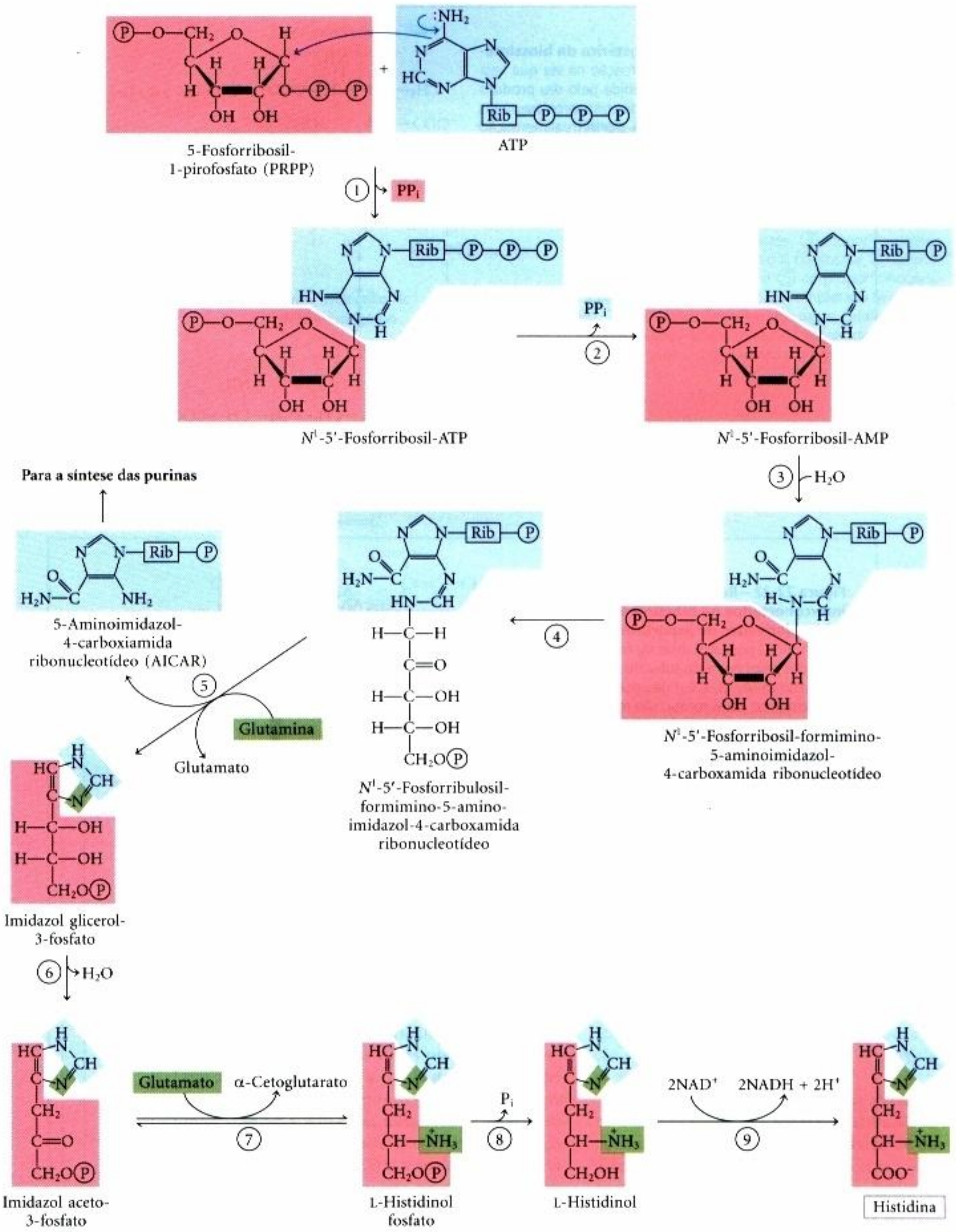

5-Fosforribosil-
1-pirofosfato (PRPP)
ATP
① PPi
N¹-5'-Fosforribosil-ATP
PPi
②
N¹-5'-Fosforribosil-AMP
③ H₂O
N¹-5'-Fosforribosil-formimino-
5-aminoimidazol-
4-carboxamida ribonucleotídeo
④
N¹-5'-Fosforribulosil-
formimino-5-amino-
imidazol-4-carboxamida
ribonucleotídeo
Para a síntese das purinas
5-Aminoimidazol-
4-carboxiamida
ribonucleotídeo (AICAR)
⑤
Glutamina
Glutamato
Imidazol glicerol-
3-fosfato
⑥ H₂O
Imidazol aceto-
3-fosfato
Glutamato
α-Cetoglutarato
⑦
L-Histidinol
fosfato
Pi
⑧
L-Histidinol
2NAD⁺
2NADH + 2H⁺
⑨
Histidina

Figura 22-20 – Biossíntese da histidina em vegetais e bactérias. Os átomos derivados do PRPP e do ATP estão sombreados em vermelho e azul, respectivamente. Dois dos nitrogênios da histidina são derivados da glutamina e do glutamato (verde). As enzimas desta via são: ① ATP fosforribosil transferase, ② pirofosfoidrolase, ③ fosforribosil-AMP cicloidrolase, ④ fosforribosilformimino-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo isomerase, ⑤ glutamina amidotransferase, ⑥ imidazol glicerol-3-fosfato desidratase, ⑦ L-histidinol fosfato aminotransferase, ⑧ histidinol fosfato fosfatase e ⑨ histidinol desidrogenase. Note que o derivado do ATP que permanece depois do passo ⑤ (AICAR) é um intermediário também na biossíntese de purinas (Fig. 22-31), de tal forma que o ATP é rapidamente regenerado.

Figura 22-21 – Regulação alostérica da biossíntese da isoleucina. A primeira reação na via que leva da treonina até isoleucina é inibida pelo seu produto final, a isoleucina. Esse foi um dos primeiros exemplos descritos de inibição alostérica por retroalimentação ("feedback"). Os passos, desde α-cetobutirato até isoleucina, correspondem aos passos ⑱ até ㉑ na Figura 22-15 (cinco passos porque ⑲ é uma reação em dois passos).

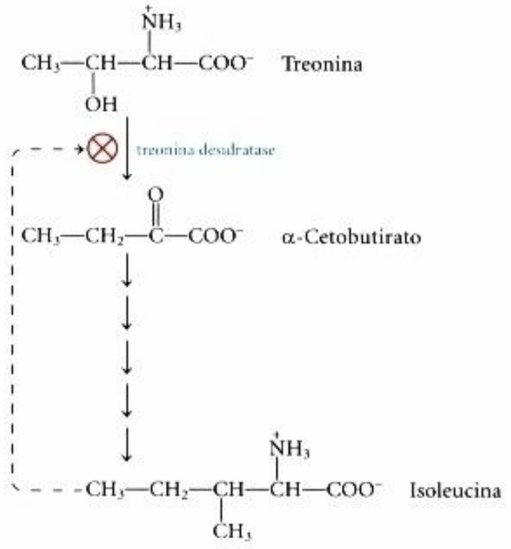
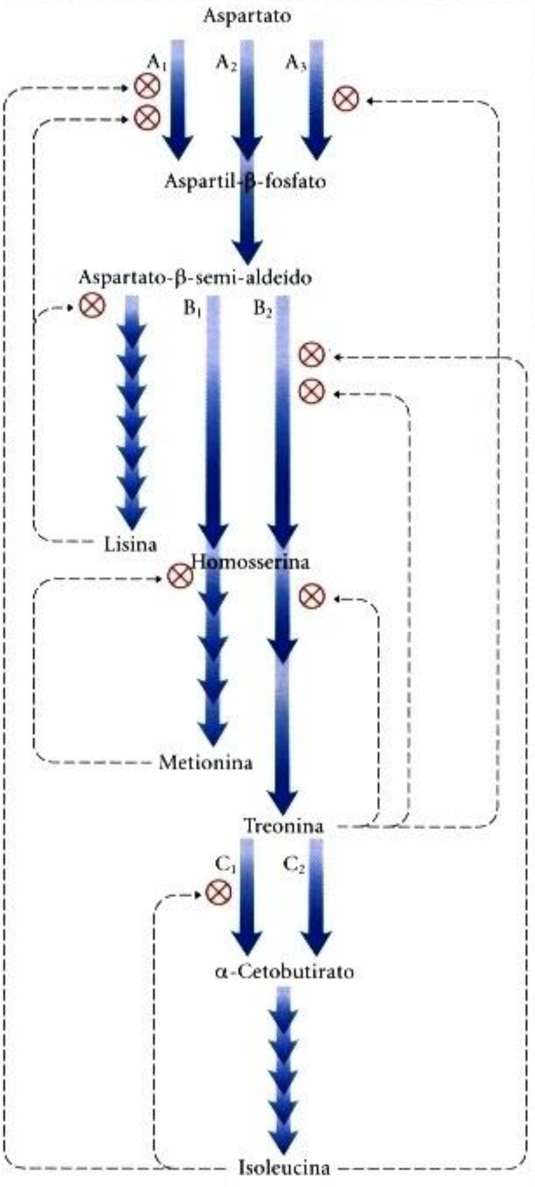

Treonina
treonina desidratase
α-Cetobutirato
Isoleucina

Figura 22-22 – Rede dos mecanismos reguladores interconectados na biossíntese de vários aminoácidos derivados do aspartato na *E. coli*. Três enzimas (A, B, C) possuem duas ou três formas isozímicas, indicadas pelos números subscritos. Em cada caso, uma das isozimas (A_2, B_1 e C_2) não possui qualquer regulação alostérica; essas formas são reguladas em nível genético (Capítulo 28) pela variação das quantidades sintetizadas. As sínteses das isozimas A_2 e B_1 são reprimidas quando os níveis de metionina são altos, e a síntese da isozima C_2 é reprimida quando os níveis de isoleucinas são altos. A enzima A é a aspartato quinase; B, a homosserina desidrogenase; C, a treonina desidratase.


Aspartato
A₁
A₂
A₃
Aspartil-β-fosfato
Aspartato-β-semi-aldeído
B₁
B₂
Lisina
Homosserina
Metionina
Treonina
C₁
C₂
α-Cetobutirato
Isoleucina

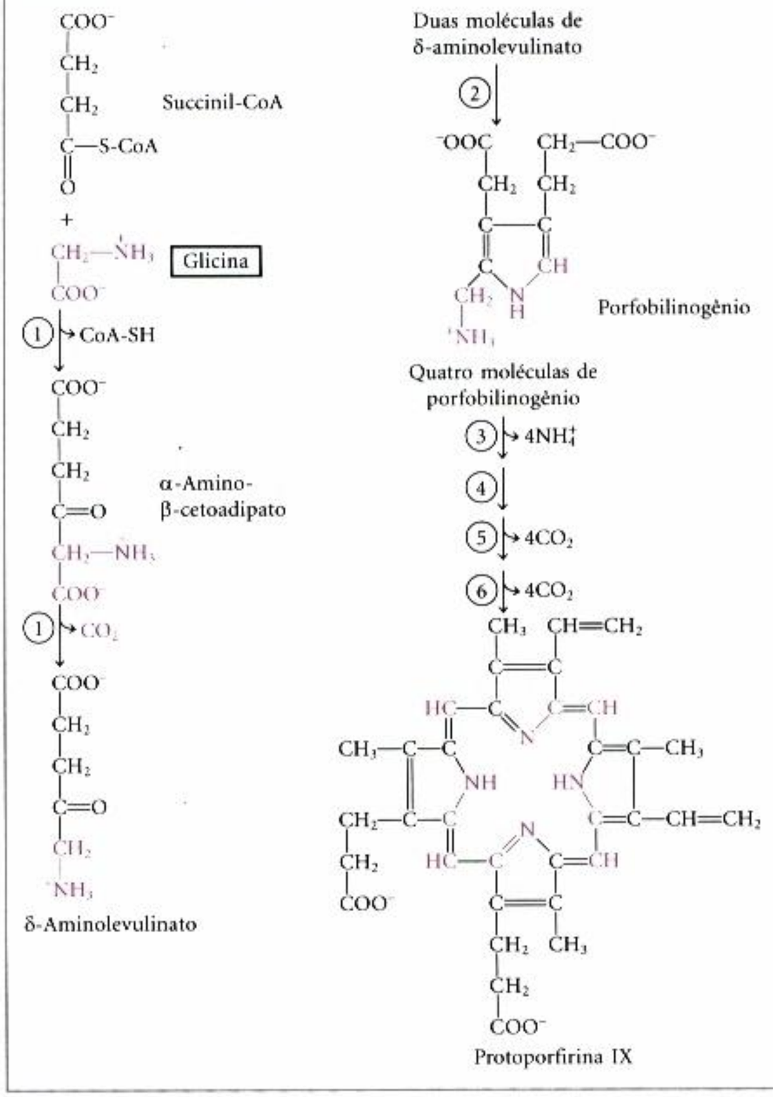


Figura 22-23 – Biossíntese da protoporfirina IX, a porfirina da hemoglobina e da mioglobina nos mamíferos. Os átomos fornecidos pela glicina estão mostrados em vermelho. Os átomos de carbono restantes são derivados do grupo succinil do succinil-CoA. As enzimas desta via são: ① δ-aminolevulinato sintase, ② porfobilinogênio sintase, ③ uroporfirinogênio sintase, ④ uroporfirinogênio III co-sintase, ⑤ uroporfirinogênio descarboxilase e ⑥ co-proporfirinogênio oxidase. O Fe^{++} necessário para completar o heme (veja Fig. 7-11) é adicionado em um passo catalisado pela enzima ferroquelatase (não está mostrada). Nas bactérias e vegetais, o glutamato é o precursor da δ-amino-levulinato.

Adendo 22-1 Bioquímica de reis e de vampiros

As porfirias são um grupo de doenças genéticas nas quais defeitos na síntese de enzimas da via biossintética que vai da glicina até as porfirinas levam a um acúmulo de precursores da porfirina nos eritrócitos, nos fluidos corporais e no fígado. A forma mais comum é a porfiria intermitente aguda provocada por uma deficiência na porfobilinogênio desaminase (veja Fig. 22-23). A maioria dos indivíduos afetados é heterozigota geralmente assintomática, porque a cópia normal do gene fornece um nível suficiente da enzima com função normal. Entretanto, fatores ambientais ou nutricionais pouco conhecidos podem provocar, nesses indivíduos, um aumento nas concentrações de δ-aminolevulinato e porfobilinogênio, levando a surtos de dor abdominal aguda e à disfunção neurológica. O rei George III, monarca britânico durante a Revolução Americana de independência e um homem sensato em circunstâncias normais, sofreu vários episódios de loucura aparente que mancharam seu desempenho real. Os sintomas exibidos nessa condição sugerem que George III sofria de porfiria aguda intermitente.

Uma das porfirias mais raras, que afetam principalmente os eritrócitos, resulta do acúmulo de uroporfirinogênio I, um isômero anormal de um dos precursores da protoporfirina. Esse composto tinge a urina de vermelho, faz com que os dentes exibam fluorescência forte sob luz ultravioleta e deixa a pele anormalmente sensível à luz solar. Devido à síntese insuficiente do heme, os indivíduos afetados são, com freqüência, anêmicos. Essa condição genética pode ser a origem dos mitos sobre vampiros das lendas populares.

Os sintomas da maioria das porfirias são agora facilmente controlados com mudanças na alimentação ou com a administração de heme ou derivados do heme.

Os aminoácidos são necessários para a biossíntese da creatina e da glutationa

A **fosfocreatina**, derivada da **creatina**, é um importante reservatório de energia no músculo esquelético (pág. 397). A creatina é sintetizada da glicina e da arginina (Fig. 22-24), e a metionina, como S-adenosilmetionina, é a doadora de grupos metila.

A **glutationa** (GSH) está presente em vegetais, em animais e em algumas bactérias, geralmente em concentrações altas, e pode ser vista com um tampão redox. Ela é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína (Fig. 22-25). O primeiro passo na sua síntese é a ativação do grupo γ-carboxila do glutamato pelo ATP para formar um acil-fosfato intermediário que reage com o grupo α-amino da cisteína. O segundo passo é similar, com o grupo α-carboxila da cisteína ativado, formando um acil-fosfato que permite a condensação com a glicina.

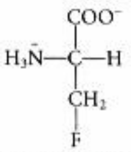
A glutationa provavelmente ajuda a manter, no estado reduzido, os grupos sulfidrila das proteínas e o íon ferro do grupo heme no estado ferroso (Fe^{2+}), funcionando ainda como agente redutor para a glutarredoxina durante a síntese de desoxirribonucleotídeos (veja Fig. 22-37). A sua função redox pode também ser empregada na remoção de peróxidos tóxicos que, sob condições aeróbicas, formam-se no curso do crescimento e no metabolismo:

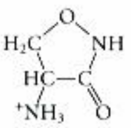
$$2GSH + R—O—O—H \longrightarrow GSSG + H_2O + R—OH$$

A forma oxidada da glutationa (GSSG) contém duas moléculas do tripeptídeo, unidas por uma ligação dissulfeto (Fig. 22-25). Essa reação é catalisada pela **glutationa peroxidase**, uma enzima notável pelo fato de conter um átomo de selênio (Se) ligado covalentemente na forma de selenocisteína (veja Fig. 5-8a) e essencial para a sua atividade.

D-Aminoácidos são encontrados primariamente em bactérias

Os D-aminoácidos não são, geralmente, encontrados fazendo parte da estrutura primária das proteínas, mas servem a algumas funções especiais na estrutura de paredes celulares bacterianas e em antibióticos peptídicos. Os peptideoglicanos (veja Fig. 9-19) das bactérias contêm D-alanina e D-glutamato. Os D-aminoácidos surgem diretamente dos isômeros L pela ação dos aminoácidos racemases, as quais têm o piridoxal fosfato como um co-fator necessário (veja Fig. 18-6). A racemização dos aminoácidos é importante para o metabolismo bacteriano e essas enzimas, como a alanina racemase, representam alvos primários para os agentes farmacêuticos. Um de tais agentes, a L-**fluoroalanina**, está sendo testado como uma droga antibacteriana. Outro, a **ciclosserina**, já é empregado para tratar a tuberculose. Como ambos os inibidores também afetam algumas enzimas humanas que necessitam de PLP, eles potencialmente possuem efeitos colaterais indesejáveis.


L-Fluoroalanina


Ciclosserina

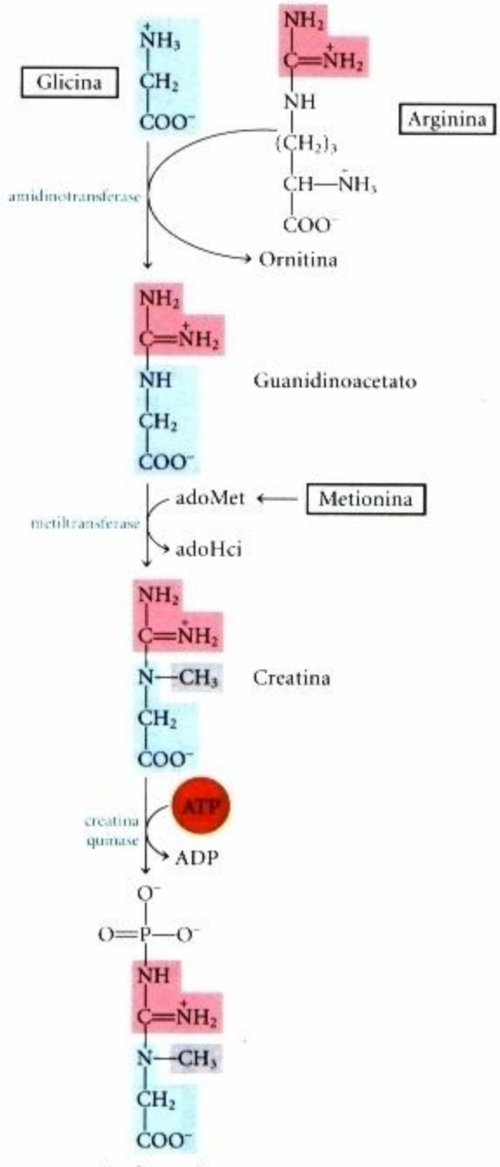


Figura 22-24 – Biossíntese da creatina e da fosfocreatina. A creatina é sintetizada a partir de três aminoácidos: glicina, arginina e metionina. Esta via mostra a versatilidade dos aminoácidos como precursores na biossíntese de outras biomoléculas nitrogenadas.

Os aminoácidos aromáticos são precursores de muitas substâncias vegetais

Nos vegetais, os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano são convertidos em uma grande variedade de compostos importantes. O polímero rígido **lignina** é derivado da fenilalanina e da tirosina e, nos tecidos vegetais, apenas a celulose é mais abundante do que ele. A estrutura da lignina é complexa e não está bem esclarecida. A fenilalanina e a tirosina também originam muitos outros produtos naturais de importância comercial, incluindo os taninos, que inibem a oxidação dos vinhos; alcalóides, que, como a morfina, exibem potentes efeitos fisiológicos; e componentes flavorizantes de produtos como óleo de cinamono ou canela, noz-moscada, baunilha, cravo e pimenta de Caiena.

O triptofano dá origem ao indol-3-acetato ou **auxina** (Fig. 22-26), que é o hormônio de crescimento vegetal. Essa molécula tem sido implicada na regulação de um largo espectro de processos biológicos nas células vegetais.

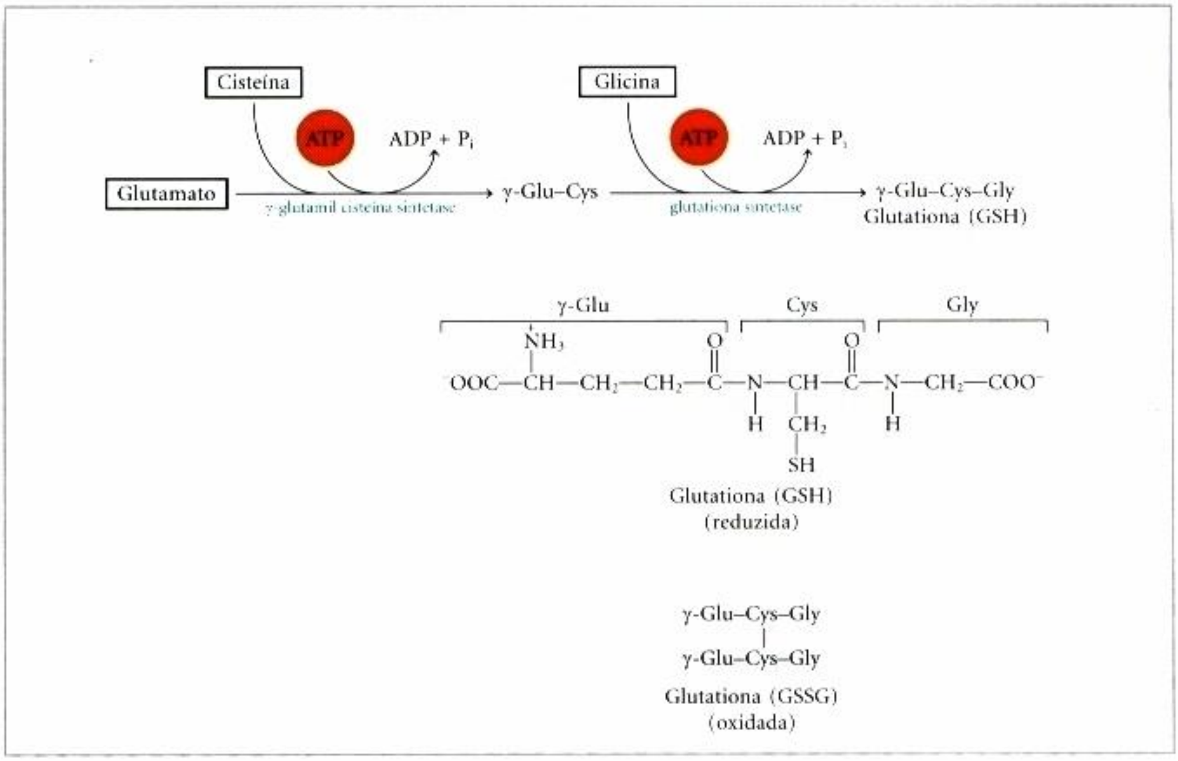

Cisteína
Glicina
ATP
ADP + P_i
Glutamato
γ-glutamil cisteína sintetase
γ-Glu–Cys
glutationa sintetase
γ-Glu–Cys–Gly
Glutationa (GSH)
γ-Glu
Cys
Gly
Glutationa (GSH)
(reduzida)
γ-Glu–Cys–Gly
γ-Glu–Cys–Gly
Glutationa (GSSG)
(oxidada)

Figura 22-25 – Biossíntese e estrutura da glutationa. Estão representadas as formas reduzida e oxidada da glutationa.

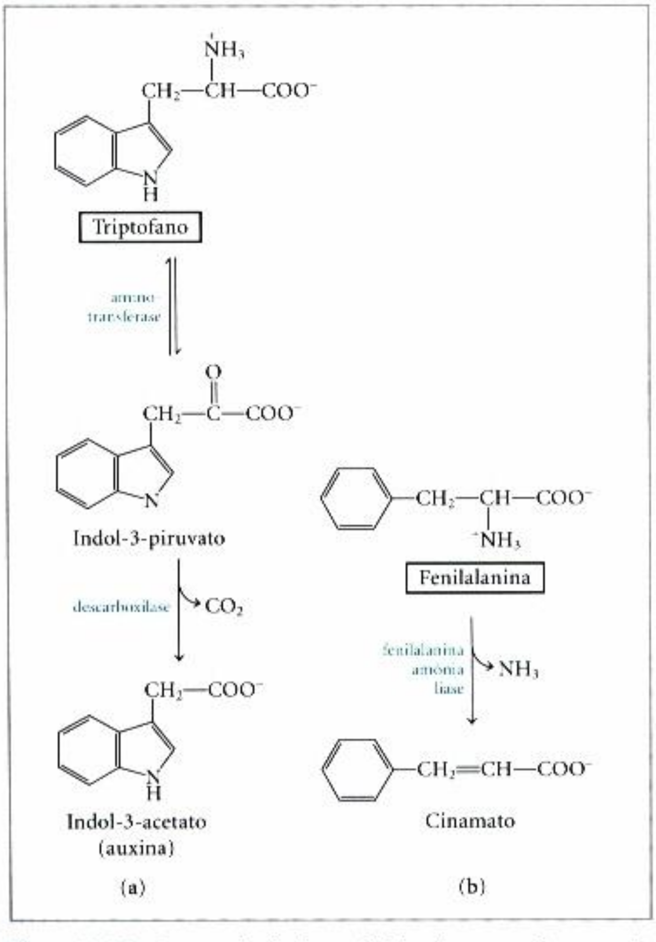

Triptofano
amino transferase
Indol-3-piruvato
descarboxilase
CO_2
Indol-3-acetato
(auxina)
Fenilalanina
fenilalanina amônia liase
NH_3
Cinamato
(a)
(b)

Figura 22-26 – Duas substâncias cuja biossíntese se faz a partir de aminoácidos. (**a**) Indol-3-acetato (auxina) e (**b**) cinamato (aroma de canela).

Os aminoácidos são convertidos em aminas biológicas por descarboxilação

Muitos neurotransmissores importantes são aminas primárias ou secundárias derivadas dos aminoácidos por meio de vias simples. Além disso, algumas poliaminas que estão complexadas com o DNA são derivadas do aminoácido ornitina, um componente do ciclo da uréia. Um denominador comum de muitas dessas vias é a reação de descarboxilação dos aminoácidos, uma reação que envolve o piridoxal fosfato (veja Fig. 18-6).

A síntese de alguns neurotransmissores está ilustrada na Figura 22-27. A tirosina dá origem a uma família de catecolaminas que inclui a **dopamina**, **norepinefrina** e **epinefrina**. Os níveis de catecolamina estão correlacionados (entre outras coisas) com mudanças na pressão sangüínea em animais. A doença de Parkinson, um distúrbio neurológico, está associada a uma subprodução de dopamina e tem sido tratada pela administração de L-dopa. Uma superprodução de dopamina no cérebro está associada a distúrbios neurológicos, como a esquizofrenia.

A descarboxilação do glutamato dá origem ao **γ-aminobutirato** (GABA), um neurotransmissor inibidor. Sua subprodução está associada às crises epilépticas. O GABA é empregado na farmacologia do tratamento da epilepsia e da hipertensão arterial. Os níveis de GABA podem ser aumentados pela administração de inibidores da enzima GABA aminotranferase que destrói o neurotransmissor.

Outro neurotransmissor importante, a **serotonina**, é derivado do triptofano por uma via de dois passos.

A histidina é descarboxilada para formar **histamina**, um vasodilatador potente, presente nos tecidos animais. A histamina é liberada em grandes quantidades, como parte da resposta alérgica, ela também estimula a secreção ácida no estômago. Um arsenal crescente de agentes farmacológicos está sendo projeta-

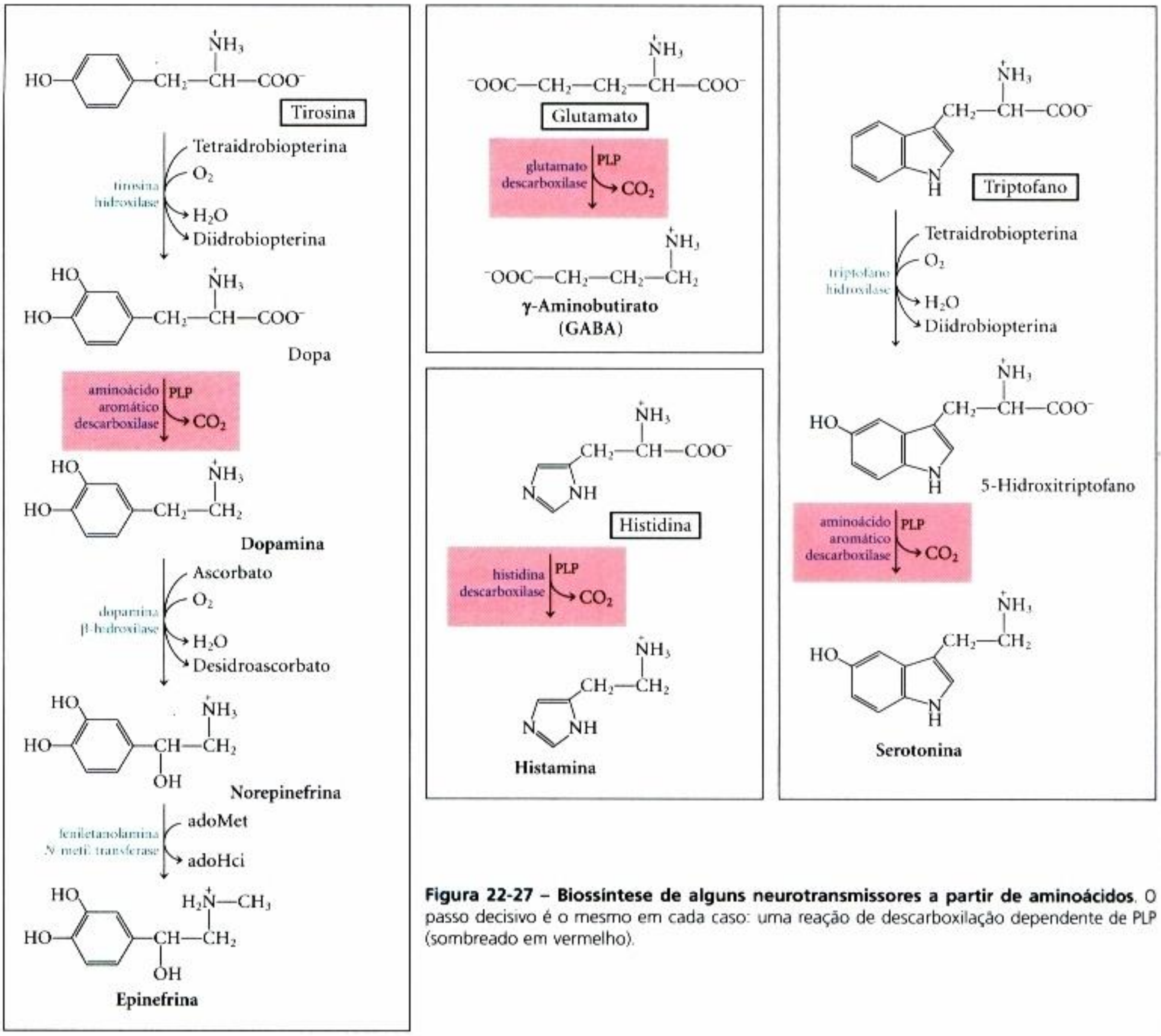
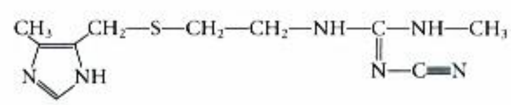

Tirosina
Tetraidrobiopterina
O_2
tirosina hidroxilase
H_2O
Diidrobiopterina
Dopa
aminoácido aromático descarboxilase
PLP
CO_2
Dopamina
Ascorbato
dopamina β-hidroxilase
Desidroascorbato
Norepinefrina
feniletanolamina N-metil transferase
adoMet
adoHci
Epinefrina
Glutamato
glutamato descarboxilase
γ-Aminobutirato (GABA)
Histidina
histidina descarboxilase
Histamina
Triptofano
triptofano hidroxilase
5-Hidroxitriptofano
Serotonina

Figura 22-27 – Biossíntese de alguns neurotransmissores a partir de aminoácidos. O passo decisivo é o mesmo em cada caso: uma reação de descarboxilação dependente de PLP (sombreado em vermelho).

do para interferir, quer com a síntese, quer com a ação da histamina. Um exemplo proeminente é o antagonista do receptor da histamina, a **cimetidina** (Tagamet) um análogo estrutural da histamina que promove a cura das úlceras duodenais pela inibição da secreção do ácido gástrico.



Cimetidina
(Tagamet)

Poliaminas, como a **espermina** e a **espermidina**, empregadas no empacotamento do DNA, são derivadas da metionina e da ornitina pela via mostrada na Figura 22-28. O primeiro passo é a descarboxilação da ornitina, um componente do ciclo da uréia e precursora da arginina (veja Fig. 22-10). A **ornitina descarboxilase** é uma enzima dependente de PLP e é o alvo de vários inibidores potentes desenvolvidos comercialmente como agentes farmacêuticos (Adendo 22-2).

A arginina é o precursor empregado na síntese biológica do óxido nítrico

Uma descorbeta surpreendente, realizada no meio da década de 1980, foi o papel do óxido nítrico (NO) como mensageiro biológico importante, já que previamente era conhecido principalmente como componente do "smog". Essa substância gasosa simples se difunde com facilidade através das membranas, embora sua grande reatividade química limite sua difusão a perto de 1mm do ponto de produção. Na espécie humana, o NO desempenha funções em um variado espectro de processos fisiológicos que incluem neurotransmissão, coagulação sangüínea e controle da pressão arterial. O mecanismo de ação está descrito no Capítulo 13 (veja pág. 349).

O óxido nítrico é produzido da arginina em uma reação dependente de NADP catalisada pela óxido nítrico sintase, uma enzima dimérica relacionada estruturalmente com a NADPH citocromo P-450 redutase (veja Adendo 21-1). A reação é uma oxidação envolvendo cinco elétrons (Fig. 22-29). Cada subunidade da enzima contém uma molécula de cada um dos quatro co-fatores: FMN, FAD, tetraidrobiopterina e heme-Fe^{3+}. O óxido nítrico é uma molécula instável e não pode ser armazenado. Sua síntese é estimulada pela interação da óxido nítrico sintase com o complexo Ca^{2+}-calmodulina (veja Fig. 13-19).

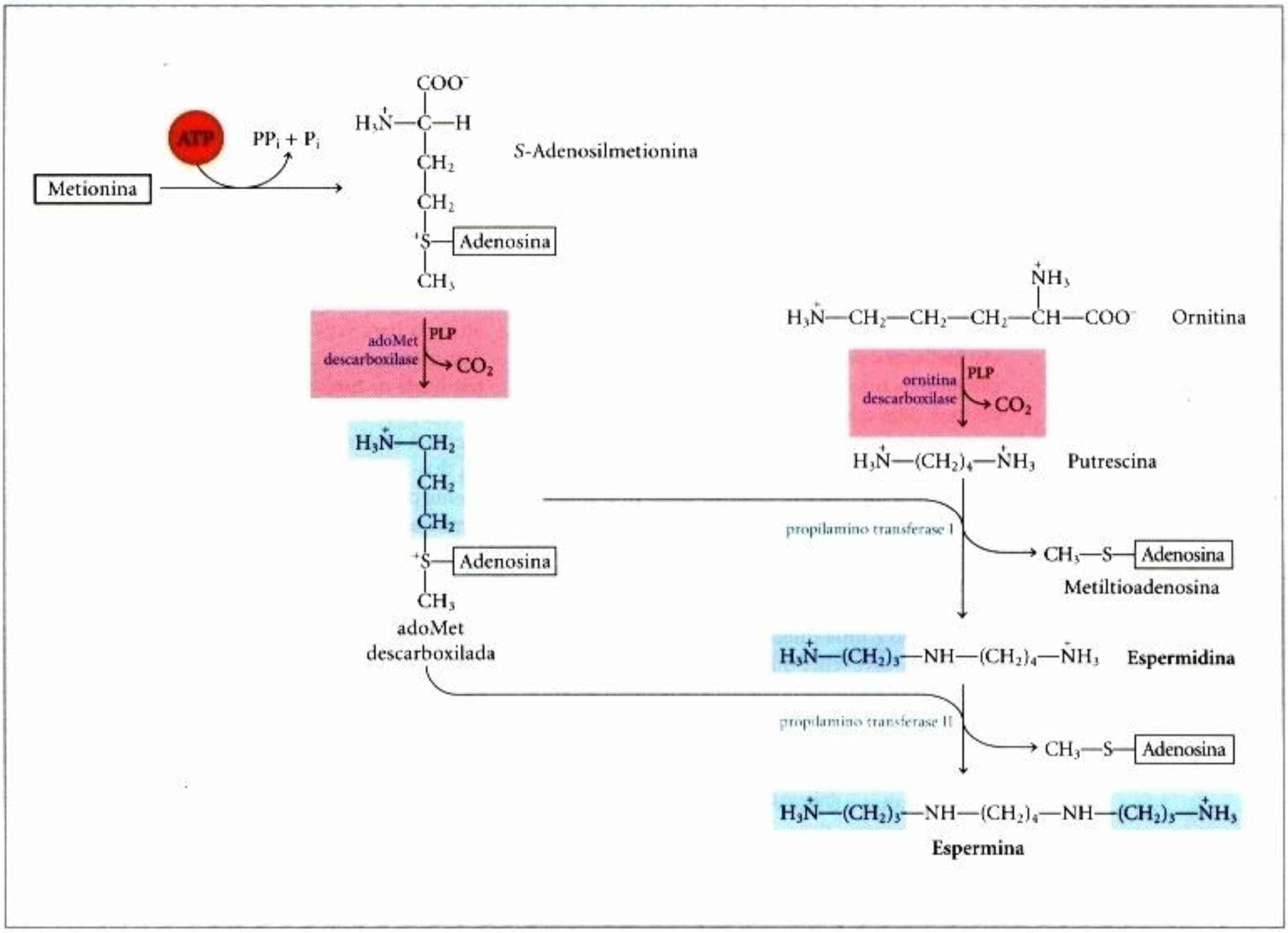

ATP
$PP_i + P_i$
Metionina
S-Adenosilmetionina
Adenosina
adoMet descarboxilase
PLP
CO_2
adoMet descarboxilada
Ornitina
ornitina descarboxilase
Putrescina
propilamino transferase I
CH_3—S—Adenosina
Metiltioadenosina
Espermidina
propilamino transferase II
Espermina

Figura 22-28 – Biossíntese da espermina e da espermidina. Os passos de descarboxilação dependente de PLP estão sombreados em vermelho. Nestas reações, a *S*-adenosilmetionina (em sua forma descarboxilada) atua como uma fonte de grupos propilamina (sombreados em azul).

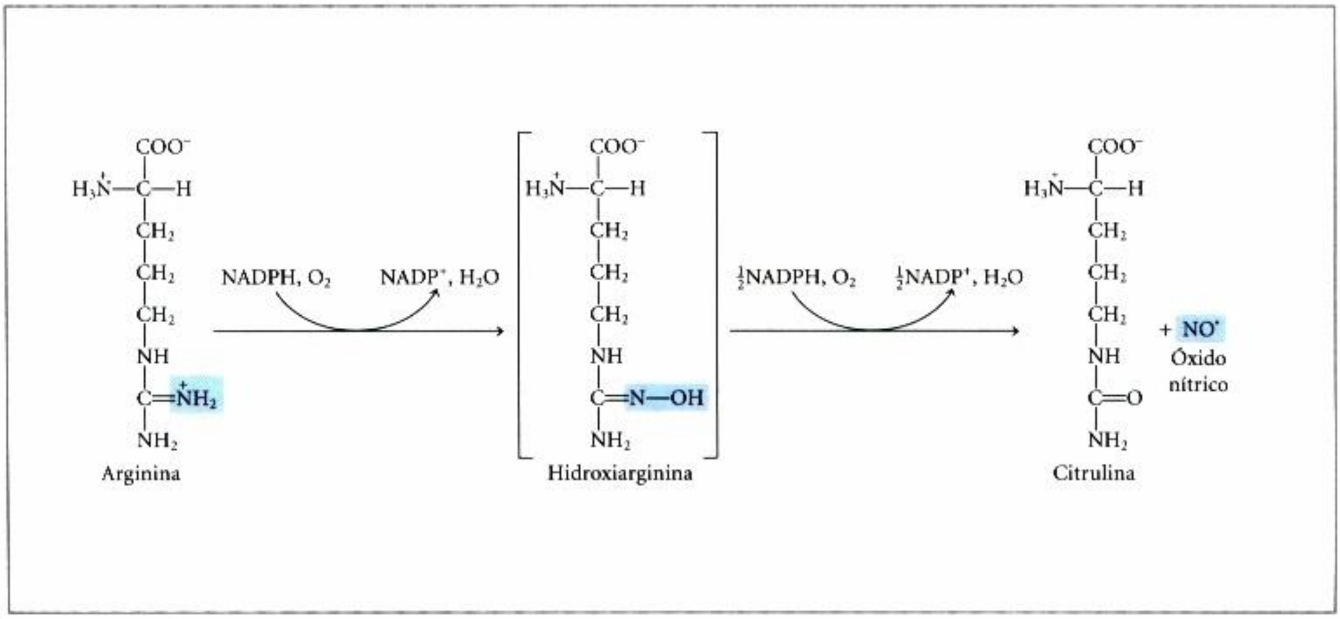

NADPH, O_2
$NADP^+$, H_2O
$\frac{1}{2}$NADPH, O_2
$\frac{1}{2}NADP^+$, H_2O
+ $NO^{\cdot}$
Óxido nítrico
Arginina
Hidroxiarginina
Citrulina

Figura 22-29 – Biossíntese do óxido nítrico. Os dois passos são catalisados pela óxido nítrico sintase. O nitrogênio do NO é cedido do grupo guanidino da arginina.

Adendo 22-2

Curando a doença do sono africana com um "cavalo de Tróia" bioquímico

A doença do sono africana (também chamada tripanossomíase africana) é causada por protistas (eucariotos unicelulares), chamados tripanossomos (Fig. 1). Essa doença (e outras causadas por tripanossomos) é de grande importância médica e econômica em muitas nações subdesenvolvidas e até recentemente são tidas como incuráveis. As vacinas são ineficazes, pois esse parasita tem um notável mecanismo de fuga do sistema imunológico do hospedeiro. A capa celular é recoberta por uma única proteína, a qual reage ao sistema imunológico do hospedeiro. Mas, de vez em quando, algumas poucas células mudam para uma nova cobertura protéica que não é reconhecida pelo sistema imunológico. Isso ocorre por um processo de recombinação genética (veja Tabela 28-1). Esse processo de "mudança de capa" pode ocorrer, talvez, centenas de vezes. O resultado é uma infecção cíclica crônica. O paciente desenvolve febre que desaparece à medida que o sistema imunológico combate e começa a vencer a primeira infecção. Entretanto, as células que mudaram de capa se tornam a semente para uma segunda infecção e a febre reaparece. Esse ciclo pode durar semanas e o paciente enfraquecido, com freqüência, morre.

Algumas abordagens modernas para o tratamento da doença do sono africana foram desenvolvidas baseadas na compreensão da enzimologia e do metabolismo. E, em pelo menos um caso, isso envolve agentes farmacêuticos projetados como inibidores de enzimas baseados no mecanismo de sua ação (inativadores suicidas; veja pág. 204). Um ponto vulnerável no metabolismo desses organismos foi encontrado na via de biossíntese das poliaminas. As poliaminas espermina e espermidina são empregadas no empacotamento do DNA, e elas são necessárias em grandes quantidades nas células em processo de multiplicação. O primeiro passo na sua síntese é catalisado pela enzima ornitina descarboxilase, uma enzima que requer PLP (veja Fig. 22-28). Nas células dos mamíferos, a ornitina descarboxilase é rapidamente reciclada; isto é, ela é continuamente degradada e uma enzima nova é sintetizada para repô-la. Por razões não compreendidas, a enzima do tripanossomo é estável e não é renovada de forma rápida por síntese. Um inibidor da ornitina descarboxilase que se liga permanentemente à enzima terá, assim, pouco efeito nas células dos mamíferos que podem substituí-la rapidamente por nova síntese, mas a enzima inativada dos parasitas não será substituída e a reprodução será inibida.

Os primeiros poucos passos da reação normal catalisada pela ornitina descarboxilase, como determinado experimentalmente, estão mostrados na Figura 2. A direção do fluxo dos pares de elétrons está mostrada por setas azuis. Uma vez liberado o CO_2, o movimento de elétrons é revertido e é produzida a putrescina (Fig. 22-28). Baseados nesse mecanismo, vários inibidores suicidas foram projetados para essa enzima. Um desses é a difluormetilornitina (DFMO). O DFMO é relativamente inerte em solução. Quando, entretanto, ele se liga à ornitina descarboxilase, a enzima é imediatamente inativada (Fig. 3). Esse inibidor fornece um absorvedor de elétrons alternativo na forma de dois átomos de flúor estrategicamente colocados e que são excelentes grupos abandonadores. Em vez de os elétrons moverem-se para a estrutura em anel do PLP, a reação resulta no deslocamento de um átomo de flúor. As cadeias laterais nucleofílicas dos aminoácidos (representadas por B:) no sítio ativo da enzima podem então reagir com o aducto inibidor-PLP, altamente reativo, formando um com-

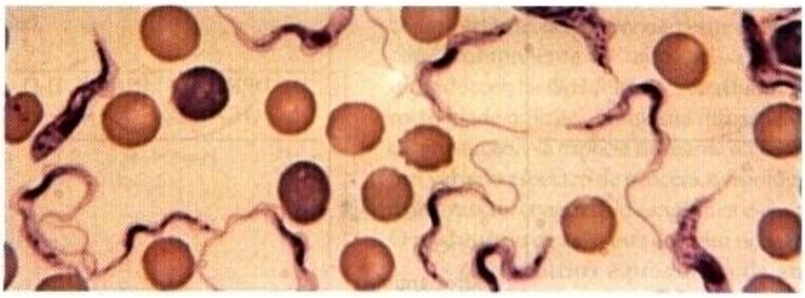


Figura 1 – O agente causador da doença do sono africana: *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

plexo covalente em uma reação essencialmente irreversível. Dessa forma, o inibidor faz uso do mecanismo de reação da própria enzima para destruí-la. O DFMO provou ser altamente efetivo contra a doença do sono africana em testes clínicos realizados na África.

Abordagens como essa representam grandes promessas para o tratamento de um grande número de doenças. A habilidade para projetar drogas baseadas em mecanismos enzimáticos e sua estrutura está substituindo o método tradicional de tentativa e erro para a produção de novas drogas.

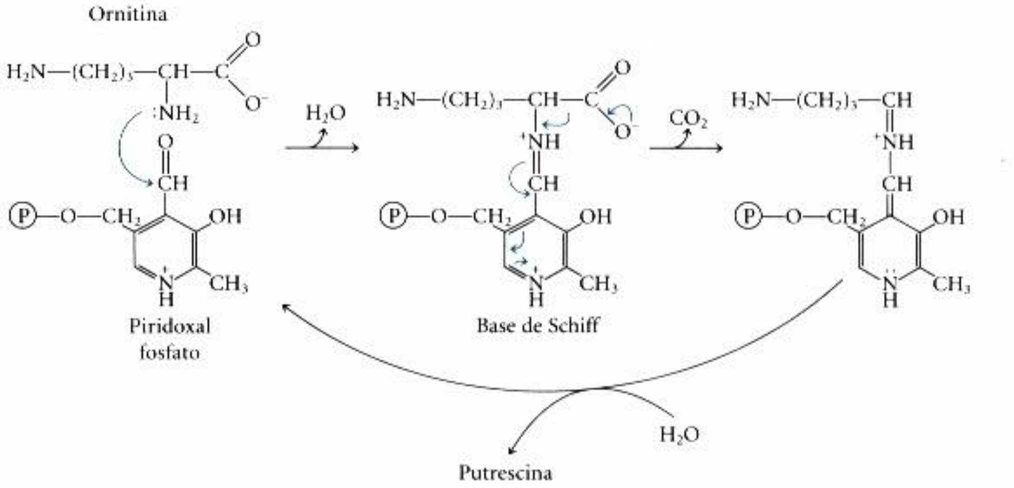

Ornitina
H2O
CO2
Piridoxal fosfato
Base de Schiff
H2O
Putrescina

Figura 2 – Mecanismo da reação catalisada pela ornitina descarboxilase.

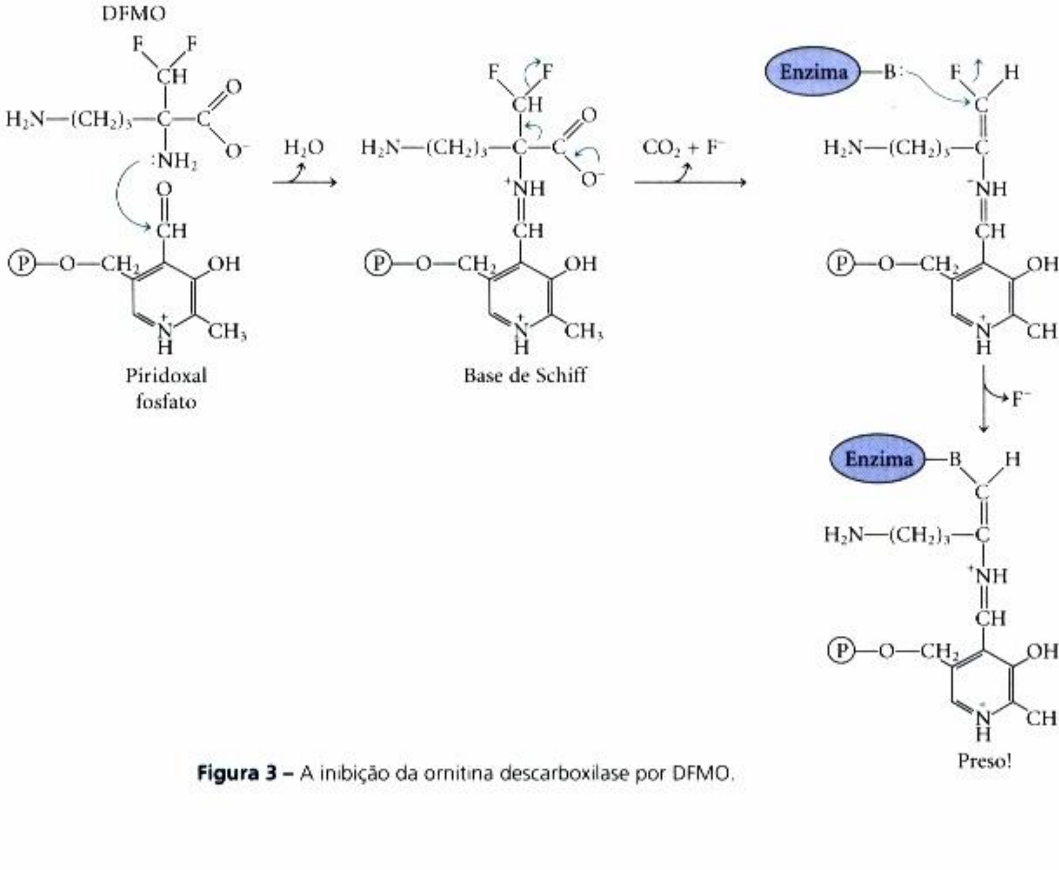

DFMO
H2O
CO2 + F⁻
Piridoxal fosfato
Base de Schiff
Enzima
F⁻
Enzima
Preso!

Figura 3 – A inibição da ornitina descarboxilase por DFMO.

Biossíntese e Degradação dos Nucleotídeos

Como foi discutido no Capítulo 10, os nucleotídeos desempenham uma grande variedade de importantes papéis em todas as células. Eles são precursores do DNA e do RNA. O ATP e, em alguma extensão, o GTP são transportadores essenciais de energia química. Os nucleotídeos são componentes dos co-fatores NAD, FAD, *S*-adenosilmetionina e coenzima A, bem como de intermediários biossintéticos ativados, como a UDP-glicose e CDP-diacilglicerol. Alguns, como o cAMP e o cGMP, também são mensageiros celulares secundários.

Existem dois tipos de vias que levam até os nucleotídeos: as **vias "de novo"** e as **vias de recuperação.** A síntese "de novo" dos nucleotídeos começa com seus precursores metabólicos: aminoácidos, ribose-5-fosfato, CO_2 e NH_3. As vias de recuperação reciclam as bases livres e os nucleosídeos liberados na quebra dos ácidos nucléicos. Os dois tipos de vias são importantes no metabolismo celular.

As vias "de novo" para a biossíntese de purinas e pirimidinas parecem estar presentes em forma idêntica em todos os organismos vivos. É notável o fato de as bases livres, guanina, adenina, timina, citidina e uracil, *não* serem intermediárias nessas vias; isto é, as bases não são sintetizadas e ligadas à ribose, como se poderia esperar. A estrutura do anel de purina é construída enquanto está ligada à ribose, durante o processo de adição de um ou de poucos átomos, de uma vez. O anel da pirimidina é sintetizado como **orotato,** ligado à ribose fosfato e, então, convertido nos nucleotídeos comuns de pirimidina empregados na síntese de ácidos nucléicos. Embora as bases livres não sejam intermediárias nas vias "de novo", elas são intermediárias em algumas das vias de recuperação.

Vários precursores importantes são compartilhados pelas vias "de novo" para as pirimidinas e purinas. O fosforribosilpirofosfato (PRPP) é importante em ambos, e, aqui, a estrutura da ribose é mantida no nucleotídeo produzido, em contraste com seu destino nas vias do triptofano e da histidina, discutido anteriormente. Em cada via, um aminoácido é um importante precursor: glicina, no caso das purinas, e aspartato, no caso das pirimidinas. Novamente, a glutamina é a fonte mais importante dos grupos amino, desempenhando esse papel em cinco diferentes passos nessas vias. O aspartato, fonte de um grupo amino, também é empregado duas vezes nas vias das purinas.

Outras duas características merecem menção. Primeira, existem evidências, especialmente nas via "de novo" das purinas, de que as enzimas estão presentes como grandes complexos multienzimáticos, um tema recorrente em nossa discussão do metabolismo. Segunda, a quantidade total de nucleotídeos nas células (excluído o ATP) é muito pequena, talvez 1% ou menos das quantidades necessárias para sintetizar o DNA celular. Portanto, a síntese de nucleotídeos precisa continuar ocorrendo durante a síntese dos ácidos nucléicos e, em alguns casos, pode limitar as velocidades de replicação e transcrição do DNA. A importância desses processos nas células em multiplicação tornou os agentes que inibem a síntese de nucleotídeos particularmente importantes para a medicina moderna.

Examinaremos posteriormente as vias biossintéticas dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos e sua regulação, a formação dos desoxinucleotídeos e a degradação das purinas e pirimidinas em ácido úrico e uréia. Finalizaremos com a discussão dos agentes quimioterápicos que afetam a síntese dos nucleotídeos.

A síntese "de novo" das purinas começa com o fosforribosilpirofosfato (PRPP)

Os dois nucleotídeos purínicos antecessores dos ácidos nucléicos são: adenosina 5'-monofosfato (AMP; adenilato) e guanosina 5'-monofosfato (GMP; guanilato). Esses nucleotídeos contêm as bases purínicas adenina e guanina, respectivamente. A Figura 22-30 mostra a origem dos átomos de carbono em nitrogênio do anel purínico, como determinado por John Buchanan, ao usar experimentos de marcação isotópica em pássaros. A via detalhada da biossíntese de nucleotídeos purínicos foi desenvolvida primeiro por Buchanan e G. Robert Greenberg nos anos 50. No primeiro passo comprometido da via, um grupo amino doado pela glutamina é ligado em C-1 do PRPP (Fig. 22-31). A **5-fosforribosilamina** resultante é altamente instável, com uma meia-vida de 30 segundos em pH 7,5. O anel purínico é subseqüentemente construído sobre essa estrutura.

John Buchanan

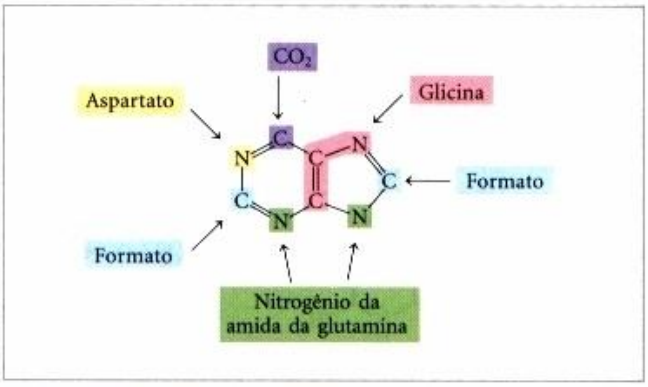


Figura 22-30 – Origem dos átomos do anel purínico. Esta informação foi obtida por meio de experiências que empregaram precursores marcados com ^{14}C e ^{15}N. O formato foi suprido na forma de N^{10}-formiltetraidrofolato.

O segundo passo é a adição de três átomos do aminoácido glicina (Fig. 22-31, passo ②). Um ATP é consumido para ativar o grupo carboxila da glicina (na forma de acil-fosfato) para essa reação de condensação. O grupo amino da glicina adicionado é então formilado pelo N^{10}-formiltetraidrofolato (passo ③), e um nitrogênio é doado pela glutamina (passo ④), antes da desidratação e do fechamento do anel de cinco membros imidazol do núcleo da purina, que é liberado como 5-aminoimidazol ribonucleotídeo (passo ⑤).

Nesse ponto, três dos seis átomos necessários para o segundo anel na estrutura purínica já estão no lugar certo. Para completar o processo, um grupo carboxila é adicionado primeiro (passo ⑥). Essa carboxilação é incomum, pois não requer bio-

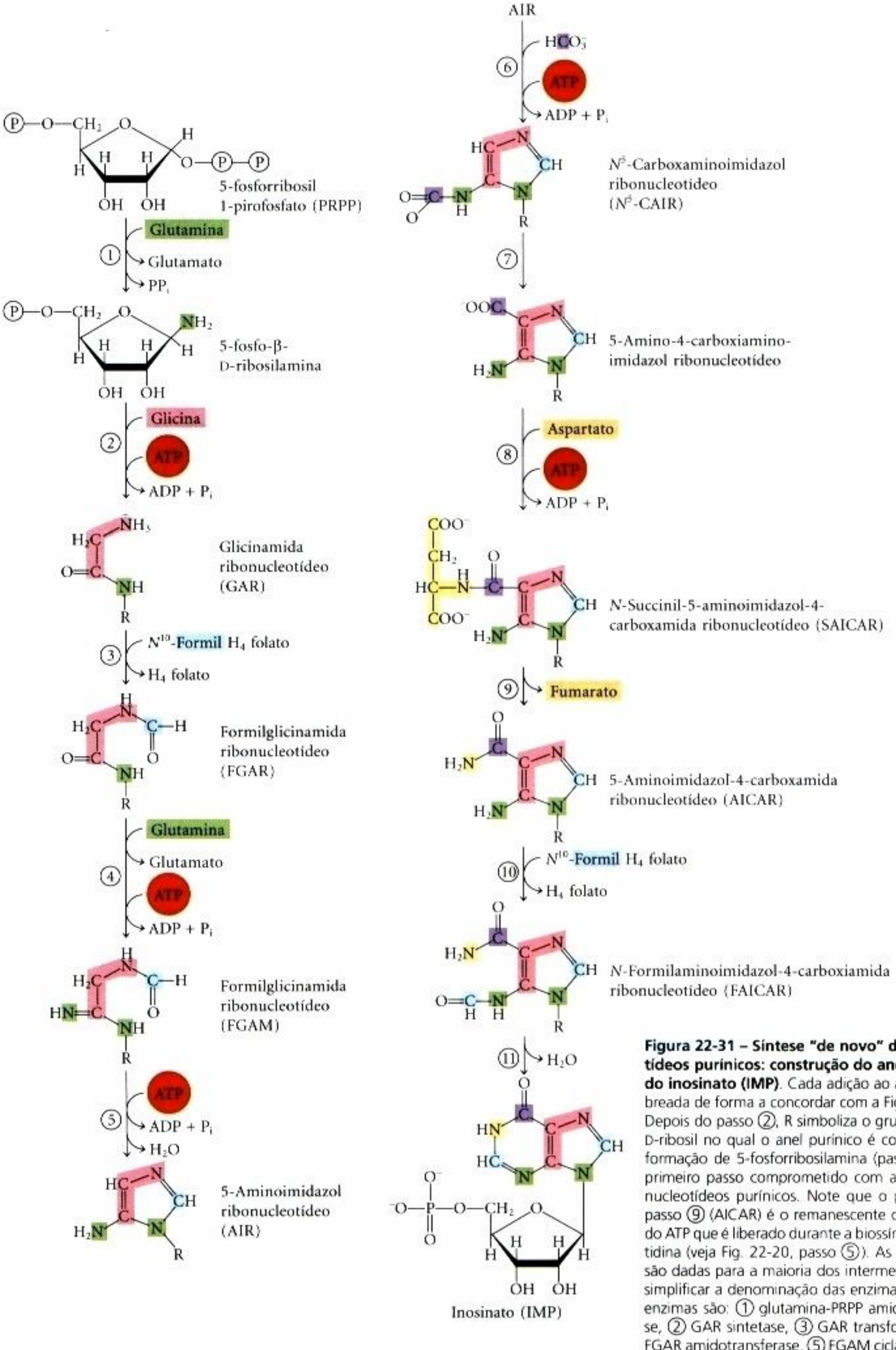

5-fosforribosil 1-pirofosfato (PRPP)
① Glutamina
Glutamato
PP_i
5-fosfo-β-D-ribosilamina
② Glicina
ATP
ADP + P_i
Glicinamida ribonucleotídeo (GAR)
③ N^{10}-Formil H_4 folato
H_4 folato
Formilglicinamida ribonucleotídeo (FGAR)
④ Glutamina
Glutamato
ATP
ADP + P_i
Formilglicinamida ribonucleotídeo (FGAM)
⑤ ATP
ADP + P_i
H_2O
5-Aminoimidazol ribonucleotídeo (AIR)
AIR
⑥ HCO_3^-
ATP
ADP + P_i
N^5-Carboxaminoimidazol ribonucleotídeo (N^5-CAIR)
⑦
5-Amino-4-carboxiamino-imidazol ribonucleotídeo
⑧ Aspartato
ATP
ADP + P_i
N-Succinil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (SAICAR)
⑨ Fumarato
5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR)
⑩ N^{10}-Formil H_4 folato
H_4 folato
N-Formilaminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo (FAICAR)
⑪ H_2O
Inosinato (IMP)

Figura 22-31 – Síntese "de novo" dos nucleotídeos purínicos: construção do anel purínico do inosinato (IMP). Cada adição ao anel é sombreada de forma a concordar com a Figura 22-30. Depois do passo ②, R simboliza o grupo 5-fosfo-D-ribosil no qual o anel purínico é construído. A formação de 5-fosforribosilamina (passo ①) é o primeiro passo comprometido com a síntese de nucleotídeos purínicos. Note que o produto do passo ⑨ (AICAR) é o remanescente da molécula do ATP que é liberado durante a biossíntese da histidina (veja Fig. 22-20, passo ⑤). As abreviações são dadas para a maioria dos intermediários para simplificar a denominação das enzimas da via. As enzimas são: ① glutamina-PRPP amidotransferase, ② GAR sintetase, ③ GAR transformilase, ④ FGAR amidotransferase, ⑤ FGAM ciclase (AIR sintetase), ⑥ N^5-CAIR sintetase, ⑦ N^5-CAIR mutase, ⑧ SAICAR sintetase, ⑨ SAICAR liase ⑩ AICAR transformilase, ⑪ IMP sintase.

tina; entretanto, ela usa o bicarbonato que, em geral, está presente nas soluções aquosas biológicas. Um rearranjo transfere o carboxilato do grupo amino exocíclico para a posição 4 do anel do imidazol (passo ⑦). O aspartato então entrega seu grupo amino para o anel de imidazol em dois passos (⑧ e ⑨): a formação de uma ligação amida é seguida pela eliminação do esqueleto carbônico do aspartato (como fumarato). Lembre-se de que o aspartato desempenha um papel análogo em dois passos no ciclo da uréia (veja Fig. 18-9). O carbono final é cedido pelo N^{10}-formiltetraidrofolato (passo ⑩), e um segundo fechamento do anel ocorre para liberar o segundo dos dois anéis fundidos do núcleo purínico (passo ⑪). O primeiro intermediário a ter um anel purínico completo é o **inosinato** (IMP).

Como nas vias biossintéticas do triptofano e da histidina, as enzimas, na via que leva ao IMP, parecem estar organizadas como grandes complexos multienzimáticos na célula. A evidência, mais uma vez, vem da existência de polipeptídeos únicos com várias funções, alguns dos quais catalisam vários passos não-seqüenciais na via. Nas células eucarióticas, indo do levedo até as moscas das frutas e os pintinhos, os passos ①, ③ e ⑤ na Figura 22-31 são catalisados por tais proteínas multifuncionais. Proteínas multifuncionais adicionais catalisam os passos ⑦ e ⑧ e os passos ⑩ e ⑪. Nas bactérias, essas atividades são encontradas em proteínas separadas, mas nessas células pode existir um complexo grande e não-covalente. A canalização dos intermediários das reações de uma enzima para a próxima permitida por esses complexos é, provavelmente, especialmente importante no caso dos intermediários instáveis, como a 5-fosforribosilamina.

A conversão do inosinato em adenilato (Fig. 22-32) requer a inserção de um grupo amino derivado do aspartato; isso ocorre por meio de duas reações similares àquelas empregadas para introduzir N-1 do anel de purina (Fig. 22-31, passos ⑧ e ⑨). Uma diferença decisiva é que o GTP é empregado em lugar do ATP como fonte de fosfato de alta energia na síntese do adenilsuccinato. O guanilato é formado pela oxidação do inosinato em C-2 usando NAD^+, seguido pela adição de um grupo amino derivado da glutamina. O ATP é rompido em AMP e PP_i no passo final (Fig. 22-32).

A biossíntese dos nucleotídeos purínicos é regulada por retroalimentação

Três mecanismos principais de retroalimentação cooperam na regulação da velocidade global da síntese "de novo" dos nucleotídeos purínicos e as velocidades relativas de formação dos dois produtos finais, adenilato e guanilato (Fig. 22-33). O primeiro desses mecanismos de controle ocorre na primeira reação, que é única na síntese desses nucleotídeos, a transferência de um grupo amino para o PRPP para formar 5-fosforribosilamina. Essa reação é catalisada pela enzima alostérica glutamina-PRPP amidotransferase, ela é inibida pelos produtos finais IMP, AMP e GMP. Esses mesmos nucleotídeos inibem a síntese do PRPP a partir da ribose fosfato pela ribose fosfato pirofosfoquinase. O AMP e o GMP agem de maneira sinérgica nessa inibição. Assim, sempre que as concentrações de AMP ou GMP vão a valores excessivos, o primeiro passo na sua via de biossíntese a partir de PRPP é inibido parcialmente.

No segundo mecanismo de controle, exercido em um estágio posterior, um excesso de GMP na célula inibe a formação de xantanilato a partir de inosinato por ação da IMP desidrogenase, sem afetar a formação da AMP (Fig. 22-33). Inversamente, um acúmulo de adenilato resulta na inibição da formação de adenilsuccinato pela adenilsuccinato sintetase, sem afetar a biossíntese da GMP. No terceiro mecanismo, o GTP é requerido na conversão de IMP em AMP, enquanto o ATP é requerido para formar GMP a partir de IMP (veja Fig. 22-32), um arranjo recíproco que tende a equilibrar a síntese dos dois ribonucleotídeos.

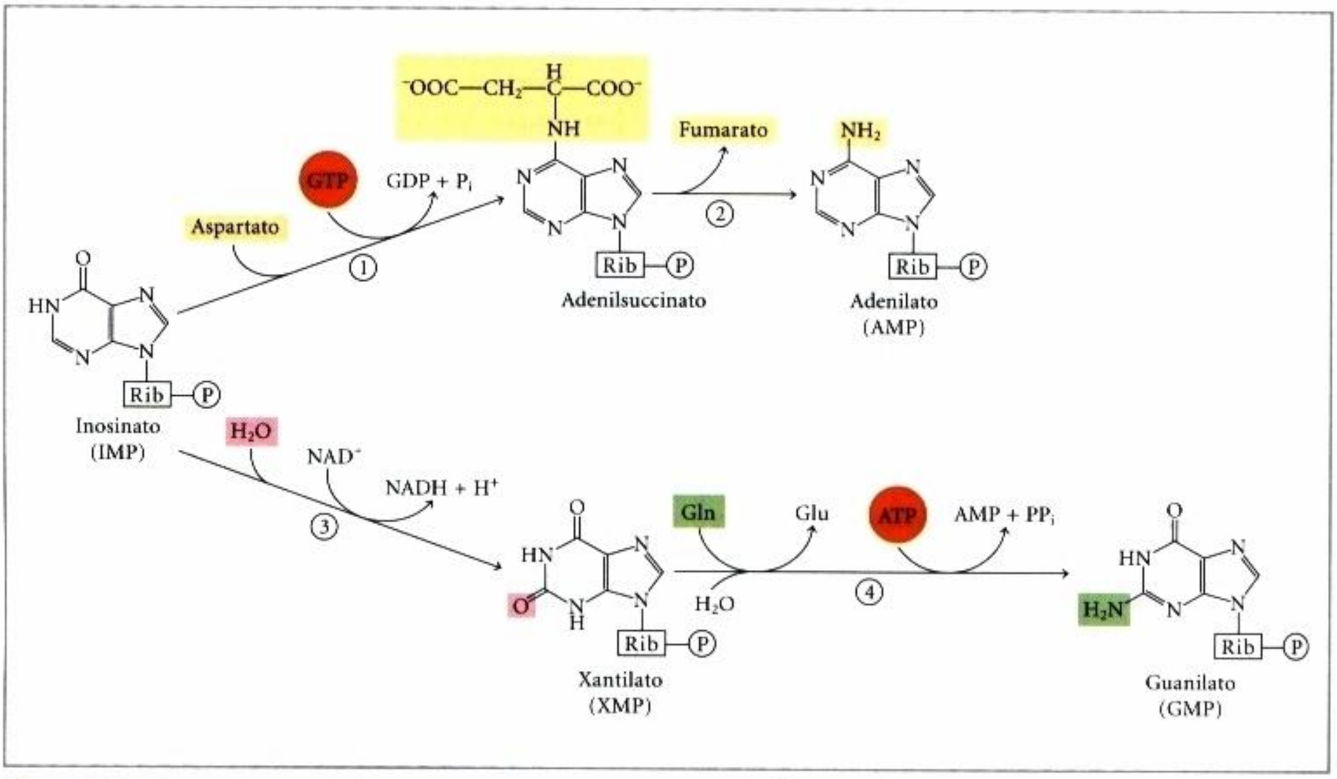


Figura 22-32 – Síntese do AMP e do GMP partindo do IMP. As enzimas são: ① adenilsuccinato sintetase, ② adenilsuccinato liase, ③ IMP desidrogenase e ④ XMP-glutamina amidotransferase.

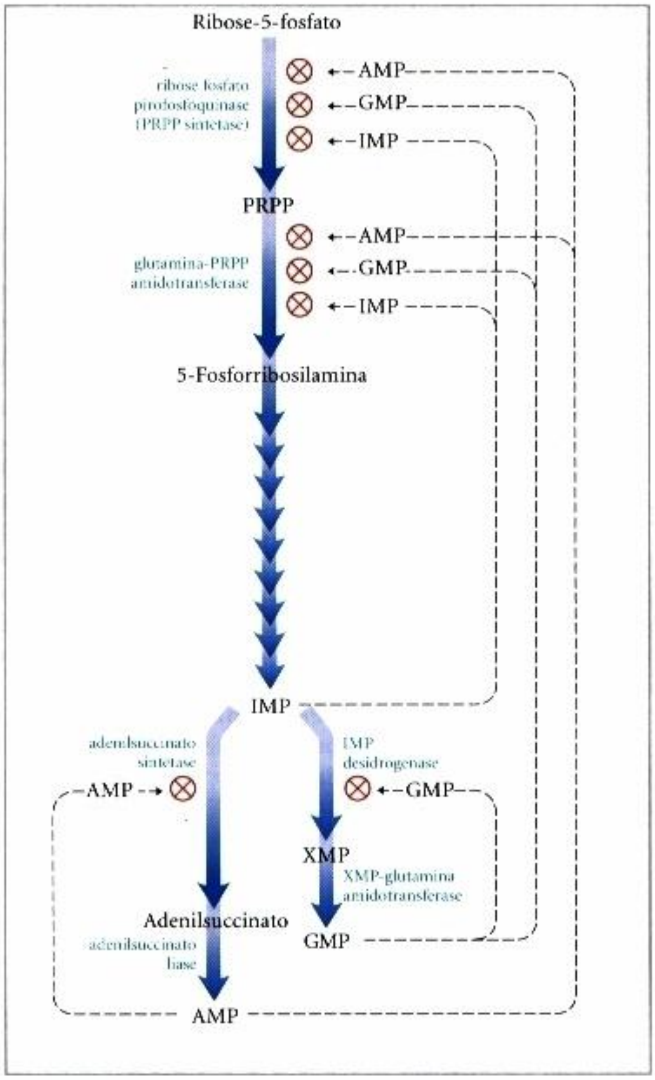

Ribose-5-fosfato
ribose fosfato pirofosfoquinase (PRPP sintetase)
AMP
GMP
IMP
PRPP
glutamina-PRPP amidotransferase
AMP
GMP
IMP
5-Fosforribosilamina
IMP
adenilsuccinato sintetase
AMP
IMP desidrogenase
GMP
XMP
XMP-glutamina amidotransferase
Adenilsuccinato
adenilsuccinato liase
GMP
AMP

Figura 22-33 – Mecanismos de controle da biossíntese dos nucleotídeos de adenina e guanina na *E. coli*. A regulação destas vias em outros organismos é diferente.

Os nucleotídeos pirimidínicos são sintetizados a partir de aspartato, PRPP e carbamil fosfato

Os ribonucleotídeos pirimidínicos comuns são a citidina 5'-monofosfato (CMP; citidilato) e a uridina 5'-monofosfato (UMP; uridilato), que contêm as pirimidinas citosina e uracil. A biossíntese "de novo" dos nucleotídeos pirimidínicos (Fig. 22-34) ocorre de forma um pouco diferente da síntese dos nucleotídeos purínicos; nesse caso, o anel pirimidínico com seis átomos é formado primeiro e depois ligado à ribose-5-fosfato. Nesse processo, é necessária a presença de carbamil fosfato, que é também um intermediário no ciclo da uréia (veja Fig. 18-9). Entretanto, como notamos no Capítulo 18, o carbamil fosfato requerido na síntese da uréia, nos animais, é feito na mitocôndria pela carbamil fosfato sintetase I, enquanto o carbamil fosfato necessário na biossíntese do anel pirimidínico é feito no citosol, por uma forma diferente de enzima, a **carbamil fosfato sintetase II**. Nas bactérias, uma única enzima fornece o carbamil fosfato para a síntese da arginina e das pirimidinas. A enzima bacteriana tem três sítios ativos separados e espaçados ao longo de um canal de perto de 100 angstrons de comprimento (Fig. 22-35). A carbamil fosfato sintetase bacteriana fornece uma ilustração vívida da canalização de intermediários instáveis entre diferentes sítios ativos.

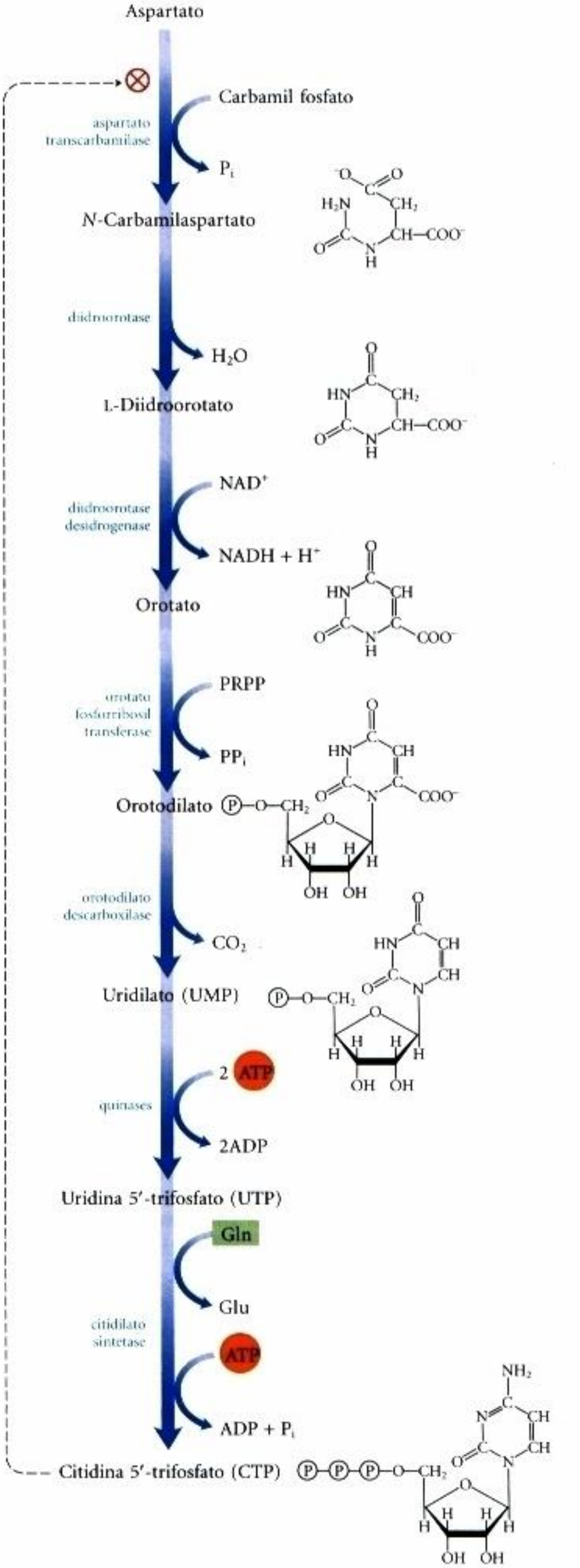

Aspartato
aspartato transcarbamilase
Carbamil fosfato
Pi
N-Carbamilaspartato
diidroorotase
H2O
L-Diidroorotato
diidroorotase desidrogenase
NAD+
NADH + H+
Orotato
orotato fosforribosil transferase
PRPP
PPi
Orotodilato
orotodilato descarboxilase
CO2
Uridilato (UMP)
quinases
2 ATP
2ADP
Uridina 5'-trifosfato (UTP)
citidilato sintetase
Gln
Glu
ATP
ADP + Pi
Citidina 5'-trifosfato (CTP)

Figura 22-34 – Síntese "de novo" dos nucleotídeos pirimidínicos: síntese do UTP e do CTP via orotidilato. A pirimidina é construída do carbamil fosfato e do aspartato. A ribose-5-fosfato é adicionada ao anel pirimidínico completado pela orotato fosforribosil transferase. O primeiro passo nesta via (não mostrado aqui, veja Fig. 18-10) é a síntese do carbamil fosfato a partir de CO_2 e NH_4^+, catalisada nos eucariotos pelo carbamil fosfato sintetase II.

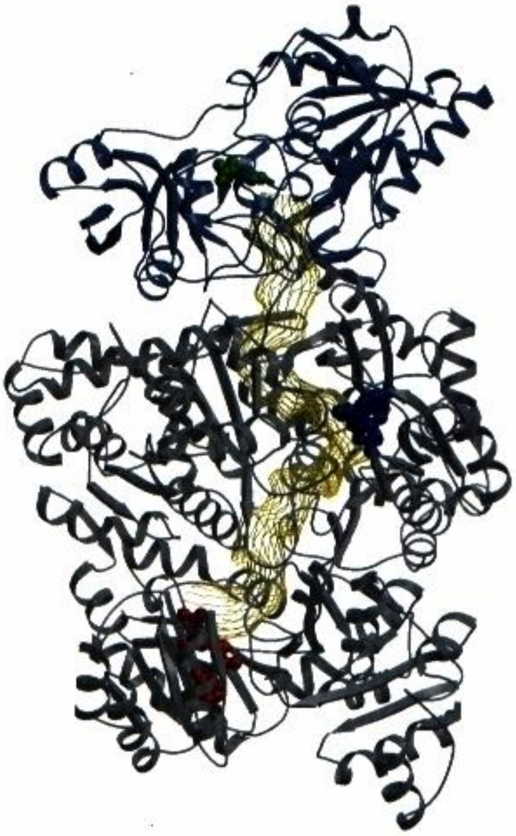


Figura 22-35 – Intermediários canalizados na carbamil fosfato sintetase bacteriana. A reação catalisada por essa enzima está ilustrada na Figura 18-10. As subunidades grande e pequena estão mostradas em azul e cinza, respectivamente. A molécula de glutamina se liga à subunidade pequena e doa seu nitrogênio amido como NH_4^+ em uma reação do tipo glutamina amidotransferase. O NH_4^+ entra em um canal (mostrado em amarelo) que o leva a um segundo sítio ativo, onde ele se combina com o bicarbonato em uma reação que requer ATP (o ADP ligado nesse segundo sítio ativo está mostrado em azul). O carbamato reentra no canal para chegar ao terceiro sítio ativo, onde é fosforilado a carbamil fosfato (o ADP ligado está mostrado em vermelho). O canal inteiro mede perto de 100 angstrons.

O carbamil fosfato reage com o aspartato para liberar *N*-carbamilaspartato no primeiro passo comprometido da biossíntese das pirimidinas. Essa reação é catalisada pela **aspartato transcarbamilase**. Esse passo é altamente regulado nas bactérias e a enzima aspartato transcarbamilase bacteriana é uma das enzimas alostéricas mais bem estudada, como será discutido mais adiante. O anel pirimidínico é fechado para formar o L-diidroorotato pela remoção de água do *N*-carbamil aspartato, essa reação é catalisada pela **diidroorotase**. Esse composto é oxidado para liberar o orotato, um derivado de pirimidina em uma reação na qual o NAD^+ é o último receptor de elétrons. Nos eucariotos, as primeiras três enzimas dessa via, carbamil fosfato sintetase II, aspartato transcarbamilase e diidroorotase, são partes de uma única proteína trifuncional. Essa proteína, que é conhecida pelo acrônimo CAD, contém três cadeias polipeptídicas idênticas (cada uma com M_r 230.000) e cada uma delas contém sítios ativos para todas as três reações. Isso sugere que complexos multienzimáticos grandes podem ser a regra tanto nessa via quanto nas demais.

Uma vez formado o orotato, a cadeia lateral da ribose-5-fosfato, fornecida mais uma vez pelo PRPP, é ligada a ele para liberar o orotidilato (Fig. 22-34). O orotidilato é então descarboxilado para liberar o uridilato e este é fosforilado para UTP. O CTP é formado do UTP pela ação da **citidilato sintetase**. Essa reação ocorre por via de um intermediário acil-fosfato (consumindo um ATP) e o doador de nitrogênio é, normalmente, a glutamina, embora o NH_4^+ possa ser empregado diretamente pelas citidilato sintetases de muitas espécies.

A biossíntese dos nucleotídeos pirimidínicos é regulada por inibição por retroalimentação

A regulação da velocidade da síntese dos nucleotídeos de pirimidina nas bactérias ocorre em grande parte por meio da enzima aspartato transcarbamilase (ATCase), a qual catalisa a primeira reação dessa via metabólica e é inibida por CTP, o produto final dessa seqüência de reações (Fig. 22-34). A molécula da ATCase bacteriana consiste de seis subunidades catalíticas e seis subunidades reguladoras (veja Fig. 8-24). As subunidades catalíticas unem-se às moléculas de substrato, e as subunidades alostéricas ligam-se ao inibidor alostérico CTP. A molécula completa da ATCase, bem como suas subunidades, podem existir em duas conformações distintas, uma é ativa e a outra inativa. Quando as subunidades reguladoras estão vazias, a enzima exibe atividade máxima. Entretanto, quando aumenta a concentração de CTP, ele ocupa as subunidades reguladoras e provoca uma mudança em suas conformações. Essa mudança é transmitida até as subunidades catalíticas que, então, mudam para uma conformação inativa. A presença de ATP impede essas mudanças induzidas por CTP. A Figura 22-36 mostra os efeitos dos reguladores alostéricos na atividade da ATCase.

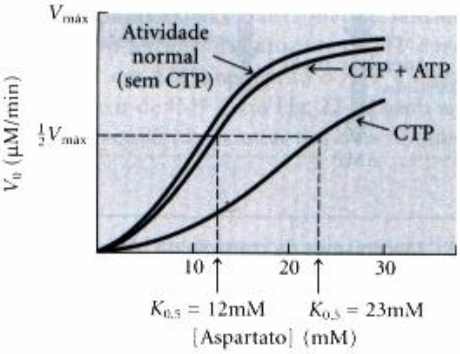


Figura 22-36 – Regulação alostérica da aspartato transcarbamilase por CTP e ATP. A adição de CTP 0,8mM, o inibidor alostérico da ATCase, aumenta o $K_{0,5}$ para o aspartato (curva mais baixa) e também a velocidade de conversão do aspartato em *N*-carbamilaspartato. O ATP em concentração de 0,6mM reverte totalmente esse efeito (curva do meio).

Os nucleosídeos monofosfato são convertidos em nucleosídeos trifosfato

Em geral, os nucleotídeos são empregados nas reações de biossíntese na forma de nucleosídeos trifosfato. As vias de conversão são comuns a todas as células. A fosforilação de AMP em ADP é promovida pela **adenilato quinase**, na reação:

$$\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2\text{ADP}$$

O ADP, assim formado, é então fosforilado à ATP pelas enzimas glicolíticas ou por meio da fosforilação oxidativa.

O ATP também realiza a formação de outros nucleosídeos difosfato pela ação de uma classe de enzimas chamadas de **nucleosídeo monofosfato quinases**. Essas enzimas são específicas para uma determinada base, mas inespecíficas para o tipo de pentose, isto é, se ribose ou desoxirribose, e catalisam a reação:

$$\text{ATP} + \text{NMP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{NDP}$$

A eficiência dos sistemas celulares para a refosforilação do ADP em ATP tende a empurrar essa reação na direção dos produtos.

Os nucleosídeos difosfato são convertidos para trifosfato pela ação de uma enzima ubíqua, a **nucleosídeo difosfato quinase**, que catalisa a reação:

$$NTP_D + NDP_A \rightleftharpoons NDP_D + NTP_A$$

Essa enzima é notável por não ser específica, quer para a base (pirimidínica ou purínica), quer para o açúcar (ribose ou desoxirribose). Essa inespecificidade se aplica ao receptor de fosfato (A) e ao doador (D), embora o doador (lado esquerdo da reação) seja quase invariavelmente ATP, uma vez que ele é o produto da respiração em condições aeróbicas e está presente em concentrações maiores que outros nucleosídeos trifosfato.

Os ribonucleotídeos são precursores dos desoxirribonucleotídeos

Os desoxirribonucleotídeos, as unidades estruturais do DNA, são derivados dos ribonucleotídeos correspondentes por meio das reações nas quais o átomo de carbono 2′ da porção de D-ribose dos ribonucleotídeos é diretamente reduzido para formar o derivado 2′-desoxi. Por exemplo, a adenosina difosfato (ADP) é reduzida para formar 2′-desoxiadenosina difosfato (dADP) e GDP é reduzido para formar dGDP. Essa redução é algo incomum, uma vez que a redução ocorre em um carbono não ativado; não é conhecida nenhuma reação que lhe seja proximamente análoga. A reação é catalisada pela **ribonucleotídeo redutase**, uma enzima mais bem caracterizada na *E. coli*, na qual os substratos são ribonucleosídeos difosfato.

A redução da porção D-ribose do ribonucleosídeo difosfato para 2′-desoxi-D-ribose requer um par de átomos de hidrogênio que, em última instância, é fornecido pelo NADPH por meio de uma proteína transportadora de hidrogênio intermediária, a **tiorredoxina**. Essa ubíqua proteína desempenha uma função redox similar na fotossíntese (veja Fig. 20-36) e em outros processos. A tiorredoxina tem pares de grupos —SH que transportam os átomos de hidrogênio do NADPH para os ribonucleosídeos difosfato. A forma oxidada ou dissulfeto da tiorredoxina é reduzida por NADPH em uma reação catalisada pela **tiorredoxina redutase** (Fig. 22-37). A tiorredoxina reduzida é então empregada pela ribonucleotídeo redutase para reduzir os nucleosídeos difosfato (NDPs) para desoxirribonucleosídeos difosfato (dNDPs). Uma segunda fonte de equivalentes redutores para a ribonucleotídeo redutase é a glutationa (GSH), que funciona como redutora para uma proteína relacionada de perto com a tiorredoxina, e é chamada **glutarredoxina.** A glutarredoxina reduzida transfere, então, a força redutora da glutationa para a ribonucleotídeo redutase (Fig. 22-37).

A ribonucleotídeo redutase é notável pelo fato de seu mecanismo de reação prover o exemplo mais bem caracterizado do envolvimento de radicais livres nas transformações bioquímicas, um fato que se pensava ser muito raro em sistemas biológicos. A enzima na *E. coli*, e na maioria dos eucariotos, é um dímero com duas subunidades, R1 e R2 (Fig. 22-38). A subunidade R1 contém dois tipos de sítios que ligam os efetores reguladores, como descrito a seguir. Os dois sítios ativos da enzima são formados na interface entre as subunidades R1 e R2. Em cada sítio ativo, R1 contribui com dois grupos tióis necessários para a atividade e R2 contribui com um radical tirosil estável. A subunidade R2 também tem um co-fator ferro binuclear (Fe^{3+}) que ajuda a gerar e estabilizar os radicais tirosil (Fig. 22-38). O radical tirosil está muito longe do sítio ativo para interagir com ele, mas gera outro radical no sítio ativo que participa da catálise.

Um possível mecanismo para a ação da ribonucleotídeo redutase está ilustrado na Figura 22-39. O radical 3′-ribonucleotídeo formado no passo ① ajuda a estabilizar o cátion formado subseqüentemente no carbono 2′ depois da perda de H_2O (passos ② e ③). Duas transferências de um único elétron, acompa-

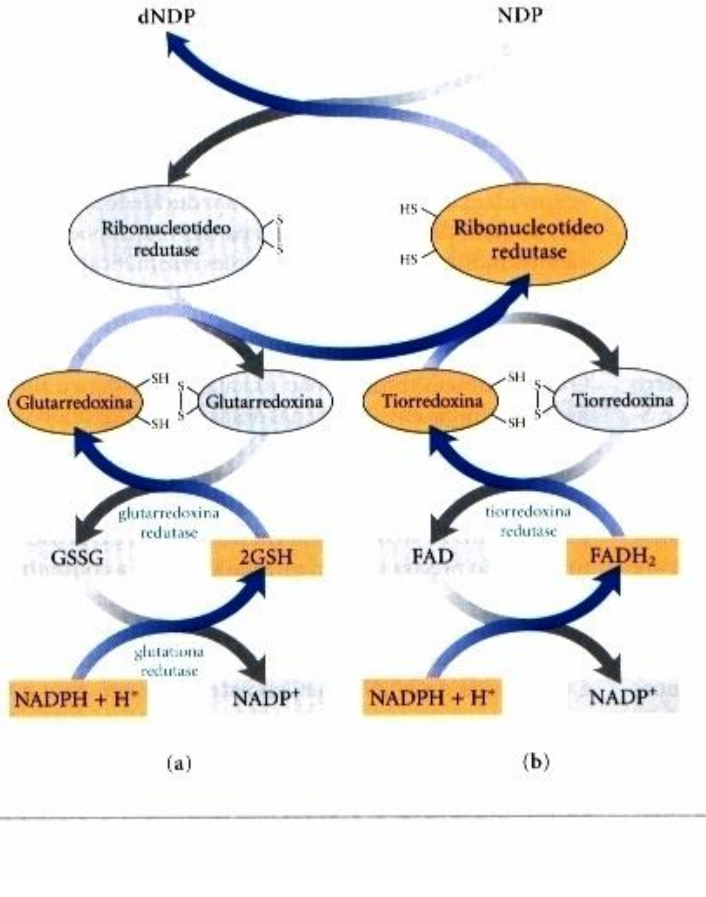


Figura 22-37 – Redução dos ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos pela ribonucleotídeo redutase. Os elétrons são transmitidos (setas azuis) do NADPH para a enzima por meio de: (**a**) glutarredoxina ou (**b**) tiorredoxina. Os grupos sulfeto na glutarredoxina redutase são fornecidos por duas moléculas de glutationa (GSH; GSSG representa a glutationa oxidada). Note que a tiorredoxina redutase é uma flavoenzima que tem o FAD como grupo prostético.

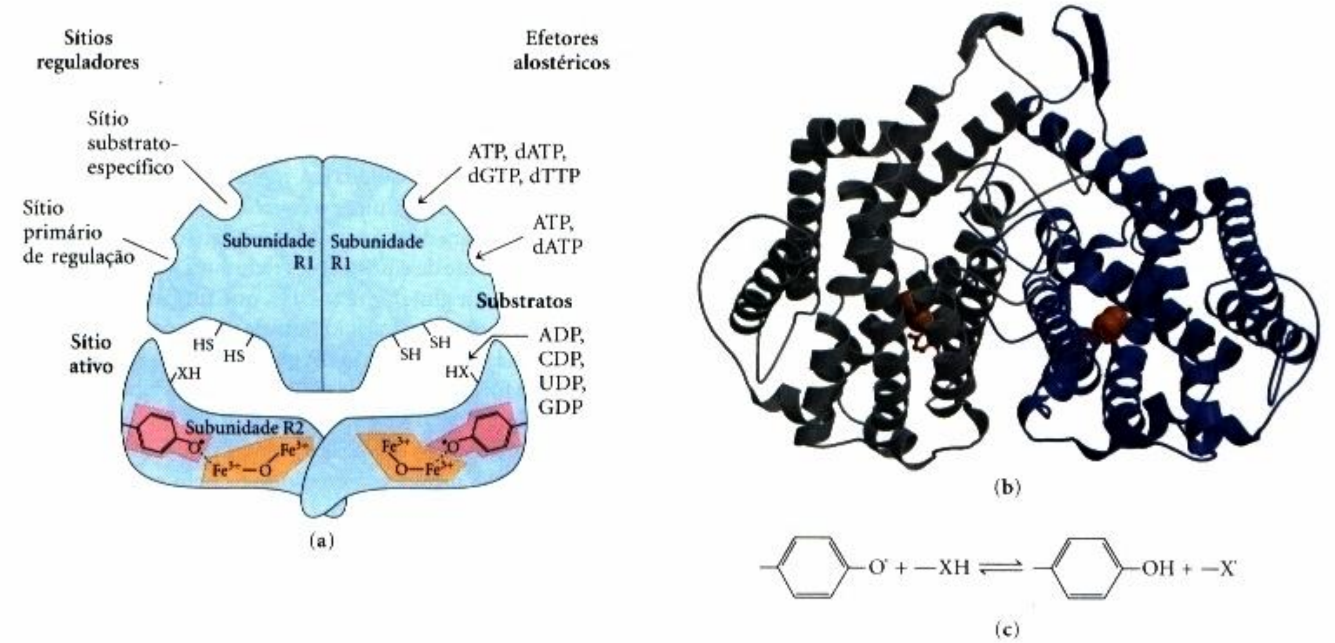


Figura 22-38 – Ribonucleotídeo redutase. (**a**) Estrutura em subunidades. As funções dos dois sítios reguladores são explicadas na Figura 22-40. O sítio ativo tem dois grupos tióis e um grupo (—XH) que pode ser convertido em um radical sítio-ativo; é provavel que esse grupo seja Cys^{439} que funciona como um radical tiol. (**b**) As subunidades R2 da ribonucleotídeo redutase da *E. coli*. O resíduo de tirosina, que funciona como radical tirosil, é mostrado em vermelho; o centro ferro binuclear está em laranja. (**c**) O radical tirosil funciona para gerar o radical sítio-ativo (—X•), que é empregado no mecanismo descrito na Figura 22-39.

nhadas por oxidação do ditiol, reduz o radical catiônico e regenera o radical 3′-ribonucleotídeo (passo ④). O passo ⑤ é a reversão do passo ①, regenerando o radical tirosil e formando o produto desoxi. O ditiol oxidado é reduzido para completar o ciclo (passo ⑥). Na *E. coli*, as fontes mais prováveis dos equivalentes redutores necessários para essa reação são a tiorredoxina e a glutarredoxina, como explicado anteriormente.

Já foram descritas quatro classes de ribonucleotídeo redutase. Seus mecanismos de ação (quando conhecidos), em geral, estão de acordo com aquele esquematizado na Figura 22-39, mas eles diferem na identidade do grupo que supre o radical sítio-ativo e os co-fatores empregados em gerá-lo. A enzima da *E. coli* (classe I) requer oxigênio para regenerar o radical tirosil quando ele é bloqueado e, por isso, funciona apenas em ambientes aeróbicos. Enzimas da classe II, encontradas em outros microrganismos, possuem 5′-desoxiadenosilcobalamina (veja Adendo 17-2) em lugar de um centro de ferro binuclear. Enzimas da classe III evoluíram para funcionar em um ambiente anaeróbico. A *E. coli* contém uma ribonucleotídeo redutase separada quando é cultivada em anaerobiose; essa forma da enzima contém um agregado ferro-enxofre (estruturalmente diferente do centro ferro binuclear das enzimas da classe I) e necessita de NADPH e *S*-adenosilmetionina para ser ativa. Ela usa, como substratos, os nucleosídeos trifosfato em lugar de nucleosídeos difosfato. Foi descrita, em alguns microrganismos, uma ribonucleotídeo redutase classe IV, que contém um centro manganês binuclear. A evolução de diferentes classes de ribonucleotídeos redutases para permitir a síntese de precursores do DNA em diferentes ambientes reflete a importância dessa reação no metabolismo dos nucleotídeos.

A regulação da ribonucleotídeo redutase da *E. coli* é incomum pelo fato de ela ter regulada não apenas sua *atividade*, mas também sua *especificidade de substrato* pela ligação das moléculas de efetores alostéricos. Existem dois tipos de sítios reguladores em cada subunidade R1 (Fig. 22-38). Um tipo afeta a atividade global da enzima e liga-se tanto a ATP, que ativa a enzima, como à dATP, que a inativa. O segundo tipo de sítio regulador altera a especificidade de substrato em resposta à molécula de efetor que é ligado pela enzima-ATP, dATP, dTTP ou dGTP (Fig. 22-40). Quando ATP ou dATP está ligado, a redução de UDP e CDP é favorecida. Quando está ligado dTTP ou dGTP, é estimulada a redução de GDP e ADP, respectivamente. O sistema está projetado para fornecer um conjunto equilibrado de precursores para a síntese de DNA. O ATP é um sinal geral para a biossíntese e a redução dos ribonucleotídeos. A presença de dATP, em pequenas quantidades, também aumenta a redução dos nucleotídeos pirimidínicos. Uma super-oferta de pirimidina dNTPs é sinalizada por altos níveis de dTPP, que muda a especificidade para favorecer a redução do GDP. Altos níveis de dGTP, por sua vez, mudam a especificidade para a redução do ADP, e altos níveis de dATP fecham a atividade da enzima. Supõe-se que esses efetores induzam várias conformações enzimáticas distintas com alterações correspondentes da especificidade.

O timidilato é derivado do dCDP e do dUMP

O DNA contém timina e não uracila, e a via para a síntese "de novo" da timina envolve apenas desoxirribonucleotídeos. O precursor imediato do timidilato (dTMP) é o dUMP. Nas bactérias, a via para dUMP começa com a formação de dUTP tanto pela desaminação de dCTP como pela fosforilação do dUDP (Fig. 22-41). O dUTP é convertido em dUMP pela dUTPase. Esta última reação precisa ser eficiente para manter a concentração de dUTP baixa e prevenir a incorporação de uridilato no DNA.

A conversão do dUMP para dTMP é catalisada pela enzima **timidilato sintase.** Nessa reação, uma unidade monocarbônica é transferida do N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato para o dUMP no nível de oxidação hidroximetil (—CH_2OH) (veja Fig. 18-16), e então reduzida para um grupo metila (Fig. 22-42). A redução ocorre ao custo da oxidação do tetraidrofolato para diidrofolato e é incomum entre as reações que empregam o tetraidrofolato

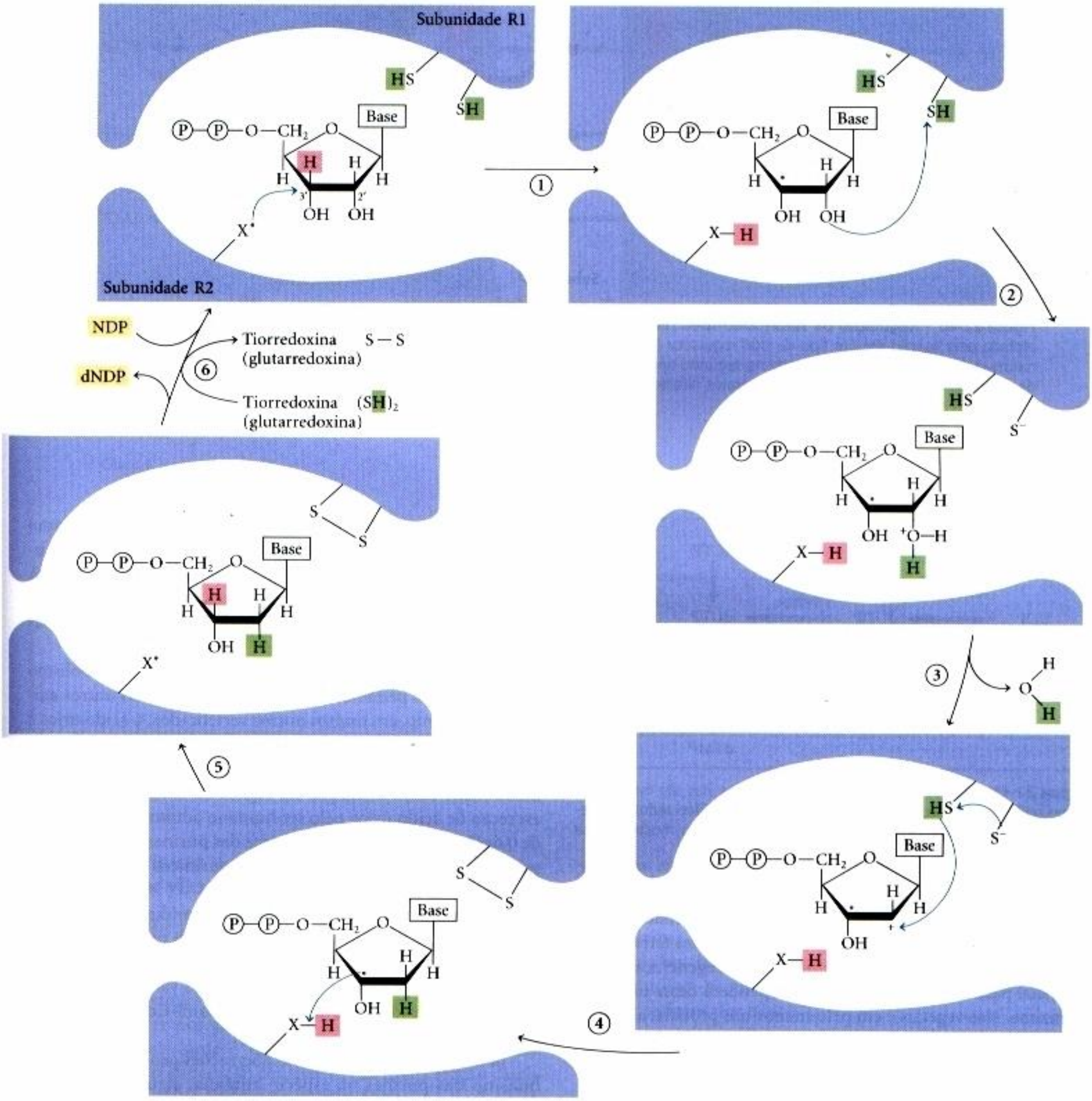

Subunidade R1
Subunidade R2
HS
SH
Base
Ⓟ—Ⓟ—O—CH₂
O
H
OH
3'
2'
X•
X—H
S⁻
⁺O—H
①
②
③
④
⑤
⑥
NDP
dNDP
Tiorredoxina S—S
(glutarredoxina)
Tiorredoxina (SH)₂
(glutarredoxina)
S
S

Figura 22-39 – Mecanismo proposto para a ribonucleotídeo redutase. Na enzima da *E. coli* e de muitos eucariotos, os grupos tióis ativos estão na subunidade R1; na *E. coli*, o radical sítio-ativo (—X•) está na subunidade R2 e provavelmente é um radical tiil da Cys^{439} na *E. coli* (veja Fig. 22-38). Os passos de ① até ⑥ estão descritos no texto.

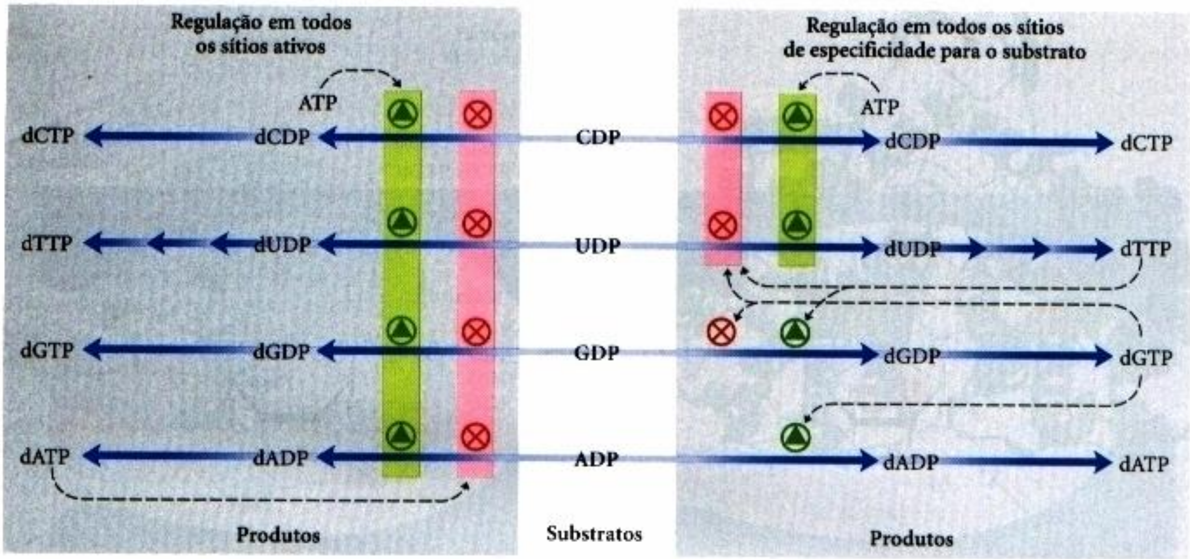


Figura 22-40 – Regulação da ribonucleotídeo redutase pelos desoxinucleosídeos trifosfato. A atividade global da enzima é afetada pela ligação em um tipo de sítio regulador (mostrado à esquerda). A especificidade do substrato da enzima é afetada pela natureza da molécula do efetor ligada no segundo tipo de sítio regulador (mostrado à direita). Está indicada a inibição ou a estimulação da atividade da enzima com quatro substratos diferentes. A via que vai de dUDP até dTTP será descrita posteriormente (veja Figs. 22-41 e 22-42).

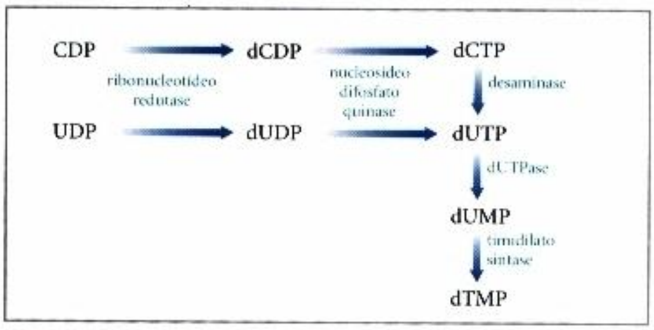


Figura 22-41 – Síntese do timidilato (dTMP). As vias são mostradas, começando com a reação catalisada pela ribonucleotídeo redutase. Detalhes da reação catalisada pela timidilato sintase estão mostrados na Figura 22-42.

como co-fator (os detalhes dessa reação são mostrados na Fig. 22-48). O diidrofolato é novamente reduzido para tetraidrofolato pela enzima **diidrofolato redutase**, uma regeneração que é essencial para muitos processos que dependem dessa forma da coenzima. Nos vegetais e em pelo menos um protista, a timidilato sintase e a diidrofolato redutase estão combinadas em um único polipeptídeo como uma proteína bifuncional.

A degradação das purinas e pirimidinas produz ácido úrico e uréia, respectivamente

Os nucleotídeos das purinas são degradados por meio de uma via na qual o grupo fosfato é perdido pela ação da **5′-nucleotidase** (Fig. 22-43). O adenilato libera a adenosina, que é então desaminada para inosina pela **adenosina desaminase**. A inosina é hidrolisada para liberar a D-ribose e a base purínica hipoxantina. A hipoxantina é oxidada sucessivamente para xantina e para ácido úrico pela **xantina oxidase**, uma flavoenzima que contém um átomo de molibdênio e quatro centros ferro-enxofre em seu grupo prostético. O receptor de elétrons nessa reação complexa é o oxigênio molecular.

O catabolismo do GMP também libera ácido úrico como produto final. O GMP é primeiro hidrolisado para liberar o nucleosídeo guanosina, o qual é clivado para liberar guanina. A guanina sofre remoção hidrolítica do seu grupo amino para liberar xantina, que é convertida em ácido úrico pela xantina oxidase (Fig. 22-43).

O ácido úrico é o produto de excreção final do catabolismo das purinas nos primatas, nos pássaros e em alguns outros animais. Entretanto, em muitos outros vertebrados, o ácido úrico é ainda mais degradado para o produto de excreção **alantoína**, pela ação da **urato oxidase**. Em outros organismos, a via é estendida ainda mais, como mostrado na Figura 22-43. A velocidade da excreção de ácido úrico pelo ser humano adulto normal é cerca de 0,6g/24h, originando-se em parte das purinas ingeridas e em parte da renovação dos nucleotídeos purínicos dos ácidos nucléicos.

Em geral, as vias de degradação das pirimidinas levam à produção de NH_4^+ e, portanto, à síntese de uréia. A timina, por exemplo, é degradada a semi-aldeído metilmalônico (Fig. 22-44), que é um intermediário na via de degradação da valina. A continuação de sua degradação leva ao metilmalonil-CoA e, depois, ao succinil-CoA.

Já foram encontradas várias aberrações genéticas do metabolismo das purinas na espécie humana, algumas com conseqüências muito sérias. Por exemplo, a **deficiência em adenosina desaminase** leva a quadros clínicos caracterizados por imunodeficiência severa na qual os linfócitos T e B não se desenvolvem adequadamente. A falta de adenosina desaminase leva a um aumento de 100 vezes na concentração do dATP, um efetor negativo forte da ribonucleotídeo redutase (Fig. 22-40). O aumento no dATP leva a uma deficiência geral nos níveis de outros dNTPs que é observada nos linfócitos T. As bases para a toxicidade nos linfócitos B é menos clara. Os pacientes com deficiências da adenosina desaminase não possuem um sistema imunológico efetivo e não sobrevivem se não são mantidos em ambientes estéreis que os protejam do ataque de microrganismos patogênicos.

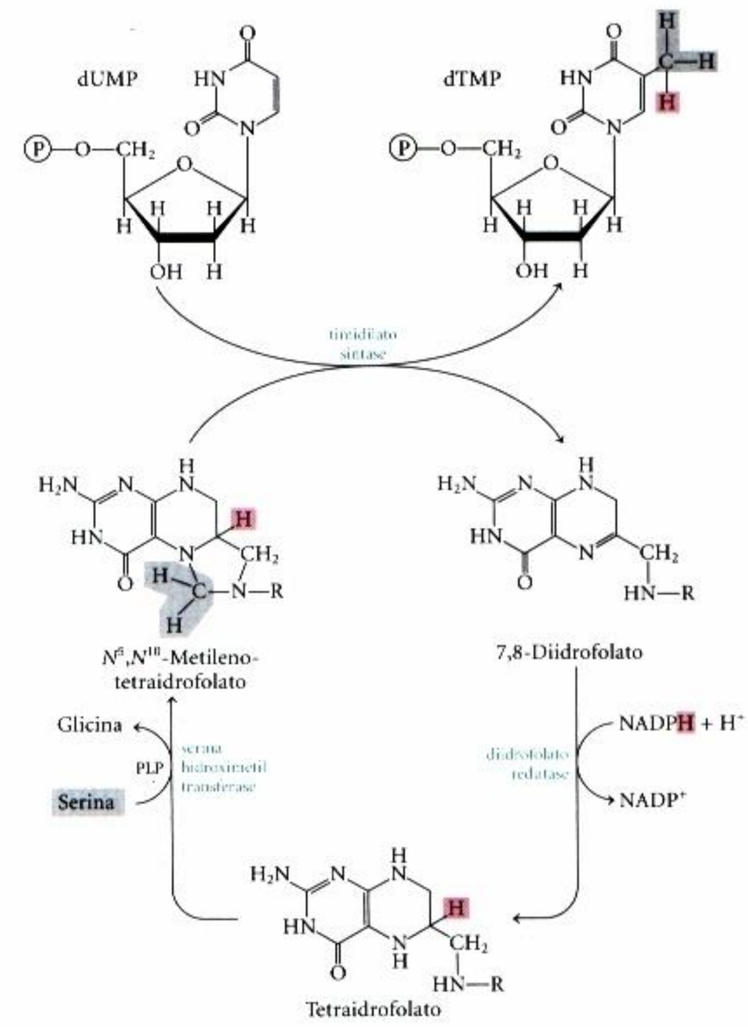


Figura 22-42 – Conversão de dUMP para dTMP pela timidilato sintase e diidrofolato redutase. A serina hidroximetil transferase é requerida para a regeneração da forma N^5,N^{10}-metileno do tetraidrofolato. Na síntese de dTMP, todos os três hidrogênios do grupo metila adicionado são derivados do N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato, como mostrado em vermelho e cinza.

As bases purínicas e pirimidínicas são recicladas por vias de recuperação

Bases purínicas e pirimidínicas são constantemente liberadas no interior das células durante a degradação metabólica dos nucleotídeos. Entretanto, as purinas livres são em grande parte recuperadas e empregadas novamente na síntese de nucleotídeos. Isso ocorre por uma via que é bastante diferente e mais simples que a biossíntese "de novo" das purinas. Uma das primeiras vias de recuperação consiste numa única reação catalisada pela **adenosina fosforribosil transferase**, na qual a adenosina livre reage com o PRPP para liberar a adenina nucleotídeo correspondente:

$$\text{Adenina} + \text{PRPP} \longrightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$$

A guanina livre e a hipoxantina (o produto de desaminação da adenina; veja Fig. 22-43) são recuperadas da mesma maneira pela **hipoxantina-guanina fosforribosil transferase**. Uma via similar de recuperação existe para as bases pirimídicas nos microrganismos, e possivelmente nos mamíferos.

A ausência por causas genéticas da atividade de hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, encontrada quase exclusivamente em crianças do sexo masculino, resulta em um conjunto de sintomas bizarros, chamado de **síndrome de Lesch-Nyhan**. As crianças com essa doença, que se manifesta ao redor da idade de dois anos, são mentalmente retardadas e apresentam péssima coordenação psicomotora. Além disso, são extremamente hostis e mostram tendências autodestrutivas compulsivas: mutilam-se, arrancando a mordidas os dedos dos pés, das mãos e pedaços dos lábios.

Os efeitos devastadores da síndrome de Lesch-Nyhan ilustram a importância das vias de recuperação. A hipoxantina e a guanina aparecem continuamente como produtos da degradação dos ácidos nucléicos. A falta da enzima crucial de recuperação hipoxantina-guanina fosforribosil transferase resulta em um aumento nos níveis de PRPP, o que leva a um aumento geral na síntese "de novo" das purinas. A superprodução de purinas leva à produção de ácido úrico a níveis altos, ocorrendo lesões teciduais semelhantes às encontradas na gota (veja adiante). O cérebro é especialmente dependente das vias de recuperação, isso pode explicar as lesões do sistema nervoso central que ocorrem nas crianças com a síndrome de Lesch-Nyhan. Essa síndrome e a doença de imunodeficiência resultante da falta de adenosina desaminase estão entre os alvos das primeiras tentativas de terapia genética na espécie humana (veja Adendo 29-2).

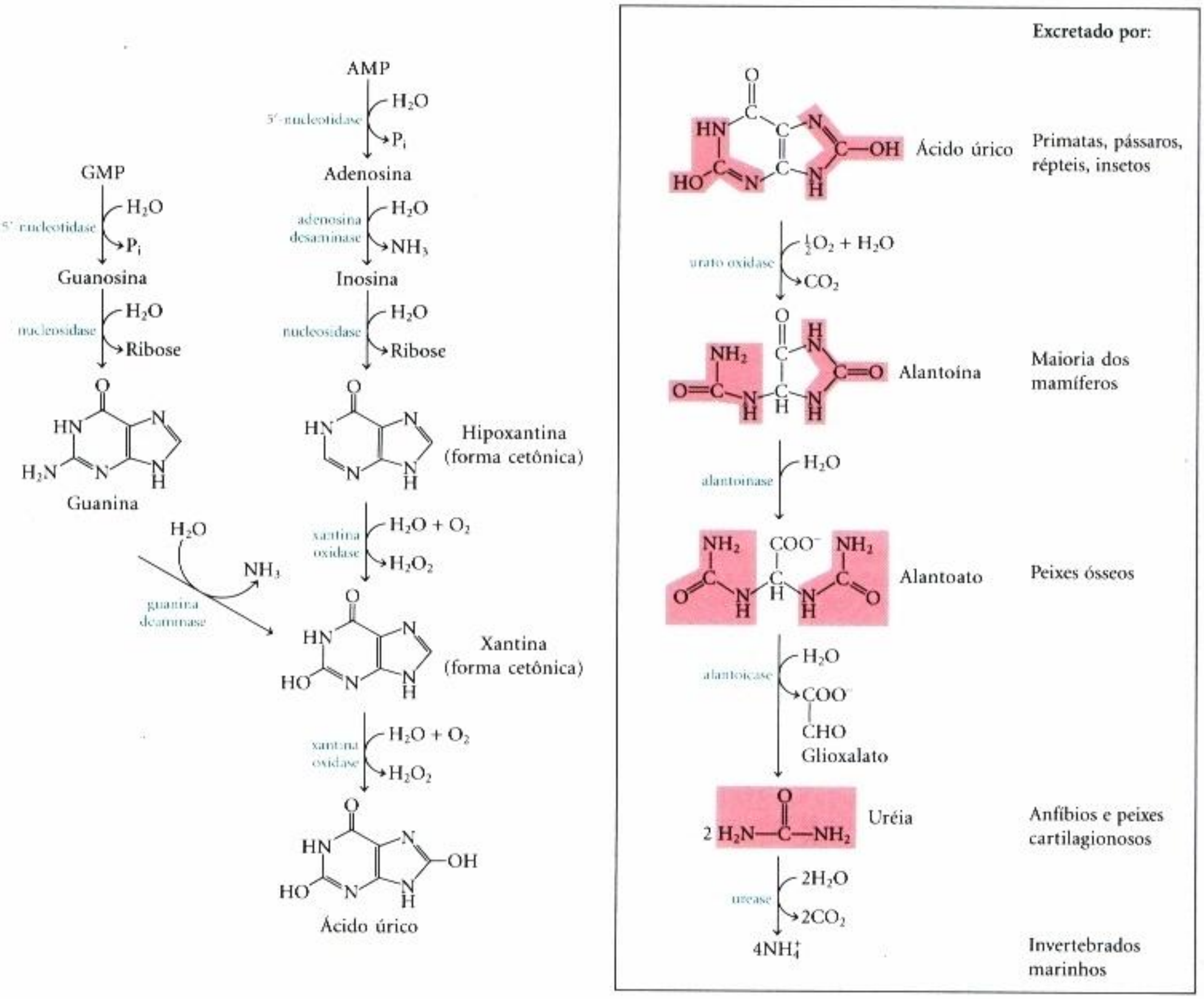

AMP
H_2O
5'-nucleotidase
P_i
Adenosina
adenosina desaminase
NH_3
Inosina
nucleosidase
Ribose
Hipoxantina (forma cetônica)
GMP
Guanosina
Guanina
guanina desaminase
xantina oxidase
$H_2O + O_2$
H_2O_2
Xantina (forma cetônica)
Ácido úrico
Excretado por:
Ácido úrico
Primatas, pássaros, répteis, insetos
urato oxidase
$\frac{1}{2}O_2 + H_2O$
CO_2
Alantoína
Maioria dos mamíferos
alantoinase
Alantoato
Peixes ósseos
alantoicase
Glioxalato
Uréia
Anfíbios e peixes cartilagionosos
urease
$2H_2O$
$2CO_2$
$4NH_4^+$
Invertebrados marinhos

Figura 22-43 – Catabolismo dos nucleotídeos purínicos. Note que, nos primatas, é excretado muito mais nitrogênio, oriundo do catabolismo das purinas, como uréia, por meio do ciclo da uréia (Capítulo 18) que como ácido úrico. De forma similar, nos peixes, é excretado muito mais nitrogênio como NH_4^+ que como uréia produzida pela via aqui mostrada.

A superprodução de ácido úrico é a causa da gota

Durante muito tempo, embora erroneamente, a causa da doença gota foi atribuída ao fato de seus portadores terem "vida boa e fácil", na verdade ela é uma doença das articulações provocada por uma elevada concentração de ácido úrico no sangue e nos tecidos. E, devido a um depósito anormal de cristais de urato de sódio, as articulações se inflamam, tornando-se dolorosas e artríticas. Os rins são afetados porque o ácido úrico também é depositado nos túbulos renais. A causa precisa da gota não é conhecida, mas suspeita-se que seja devido a uma deficiência genética de alguma enzima que atua no metabolismo das purinas.

A gota pode ser tratada eficazmente por uma combinação de terapias nutricionais e farmacêuticas. São retirados da dieta os alimentos especialmente ricos em nucleotídeos e ácidos nucléicos, tais como o fígado e produtos glandulares. Em adição, grandes melhoras se seguem ao emprego da droga **alopurinol** (Fig. 22-45), um inibidor da xantina oxidase, a enzima responsável pela conversão das purinas em ácido úrico. Quando a xantina oxidase é inibida, os produtos excretados do metabolismo da purina são a xantina e a hipoxantina, que são mais solúveis em água que o ácido úrico e, por isso, menos prováveis de provocarem depósitos cristalinos. O alopurinol foi desenvolvido por Gertrude Elion e George Hitchings, que também desenvolveram o aciclovir, empregado no tratamento da AIDS, e outros análogos das purinas, empregados na quimioterapia do câncer.

Gertrude Elion (1918-1999) e George Hitchings (1905-1998)

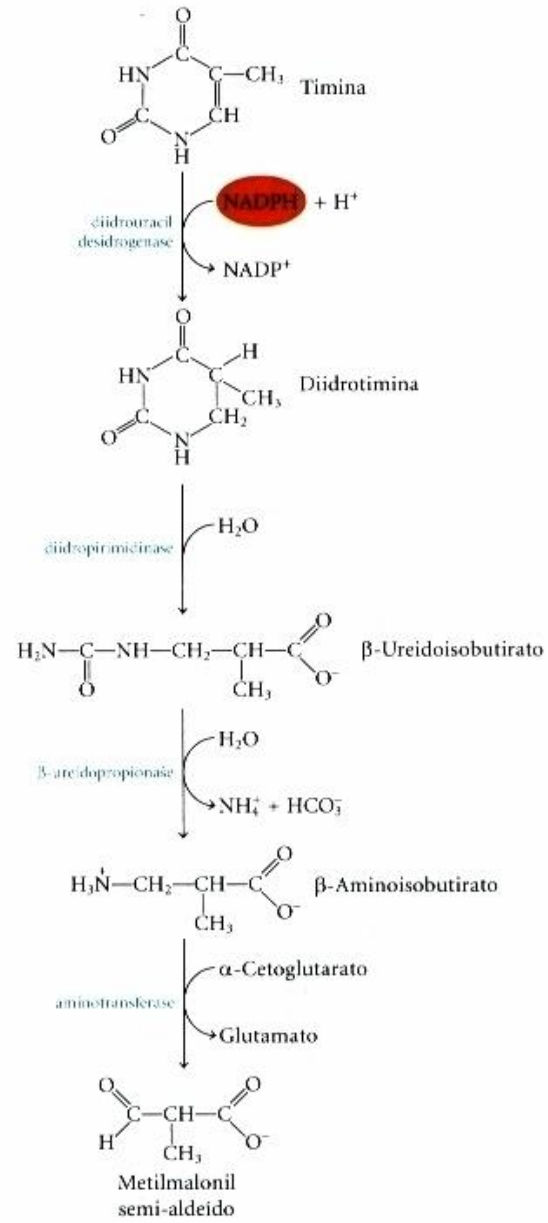

Timina
diidrouracil desidrogenase
NADPH + H⁺
NADP⁺
Diidrotimina
diidropirimidinase
H₂O
β-Ureidoisobutirato
β-ureidopropionase
H₂O
NH₄⁺ + HCO₃⁻
β-Aminoisobutirato
aminotransferase
α-Cetoglutarato
Glutamato
Metilmalonil
semi-aldeído

Figura 22-44 – Catabolismo de uma pirimidina. A via de degradação da timina.

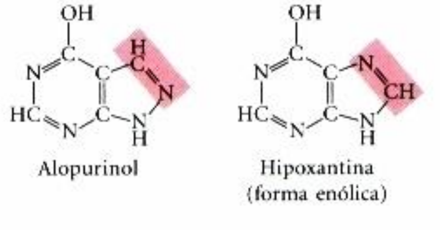

Alopurinol
Hipoxantina
(forma enólica)

Figura 22-45 – O alopurinol, um inibidor da xantina oxidase. A hipoxantina é o substrato normal dessa enzima. Apenas uma leve alteração (sombreada) na estrutura da hipoxantina libera um inibidor enzimático farmaceuticamente efetivo. O alopurinol é um exemplo de uma droga útil que foi projetada como um inibidor competitivo.

Muitos agentes quimioterápicos atuam em enzimas das vias biossintéticas de nucleotídeos

As células cancerosas crescem mais rapidamente que as células da maioria dos tecidos normais, por isso, elas têm necessidades maiores de nucleotídeos como precursores na síntese do DNA e do RNA. Conseqüentemente, as células cancerosas são, em geral, mais sensíveis aos inibidores da biossíntese de nucleotídeos que as células normais. Um conjunto cada vez mais numeroso de importantes agentes quimioterápicos age na inibição de uma ou mais enzimas dessas vias. Examinaremos vários exemplos bem estudados que ilustram essas abordagens produtivas do tratamento do câncer e facilitam o entendimento de como essas enzimas operam.

O primeiro conjunto de exemplos inclui compostos que inibem as enzimas glutamina amidotransferases. Lembre-se de que a glutamina atua como um doador de nitrogênio em, pelo menos, meia dúzia de reações separadas na biossíntese dos nucleotídeos. Os sítios de ligação para a glutamina e o mecanismo pelo qual o NH_4^+ é extraído são bastante similares em muitas dessas enzimas. A maior parte delas é fortemente inibida por análogos da glutamina como a **azasserina** e a **acivicina** (Fig. 22-46). A azasserina, caracterizada por John Buchanan nos anos 1950, foi um dos primeiros exemplos de um inativador enzimático que funciona em base do mecanismo de reação da enzima (inibidor suicida; veja pág. 205 e Adendo 22-2). A acivicina parece ser promissora como agente quimioterápico do câncer.

Outros alvos úteis para agentes farmacêuticos são as enzimas timidilato sintase e diidrofolato redutase (Fig. 22-47). Essas enzimas constituem a única via celular para a síntese da timina. Outro agente quimioterápico importante é o inibidor que age na timidilato sintase, o **fluorouracil**. O fluorouracil, por si mesmo, não é inibidor. Na célula, uma via de recuperação con-

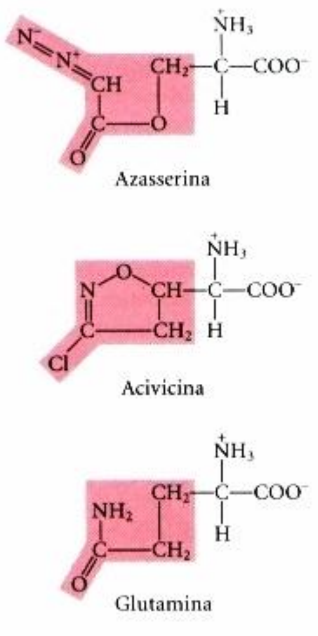

Azasserina
Acivicina
Glutamina

Figura 22-46 – Azasserina e acivicina, inibidores da glutamina amidotransferase. Esses análogos da glutamina interferem em um certo número de vias biossintéticas de aminoácidos e nucleotídeos.

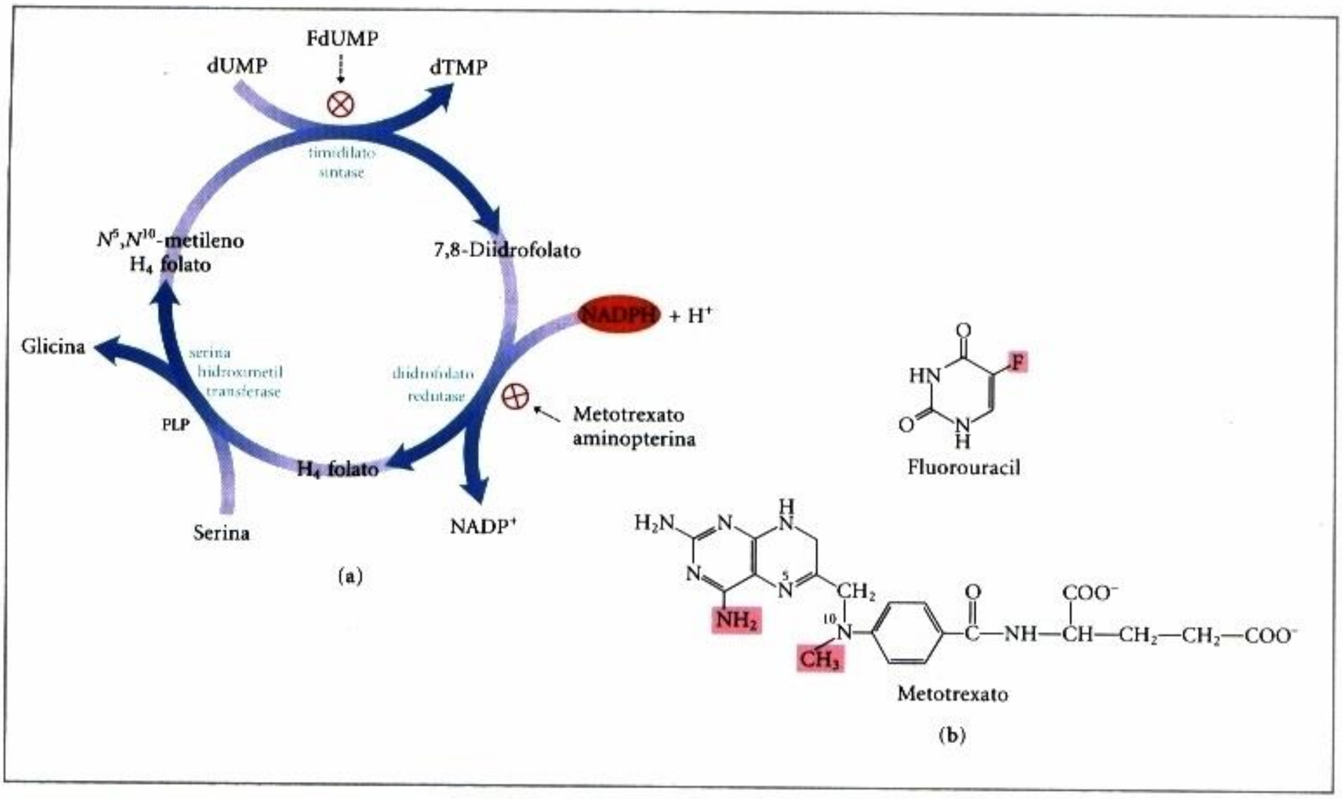

FdUMP
dUMP
dTMP
timidilato sintase
N^5,N^{10}-metileno H_4 folato
7,8-Diidrofolato
NADPH + H⁺
Glicina
serina hidroximetil transferase
diidrofolato redutase
Metotrexato aminopterina
PLP
H_4 folato
Serina
NADP⁺
(a)
Fluorouracil
Metotrexato
(b)

Figura 22-47 – A síntese do timidilato e o metabolismo do folato como alvos da quimioterapia. (**a**) Durante a síntese do timidilato, N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato é convertido em 7,8-diidrofolato. O N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato é regenerado em dois passos. O ciclo resultante do metabolismo do folato é um alvo principal de vários agentes quimioterápicos. (**b**) Os importantes agentes quimioterápicos, fluorouracil e metotrexato. Nas células, o fluorouracil é convertido em FdUMP e este inibe a timidilato sintase. O metotrexato é um análogo estrutural do tetraidrofolato e inibe a diidrofolato redutase. Os grupos amino e metila sombreados em vermelho no metotrexato substituem um oxigênio carbonila e um próton, respectivamente, no folato (veja Fig. 22-42). A aminopterina, outro análogo importante do folato, é idêntica ao metotrexato, exceto que nela falta o grupo metila sombreado em vermelho.

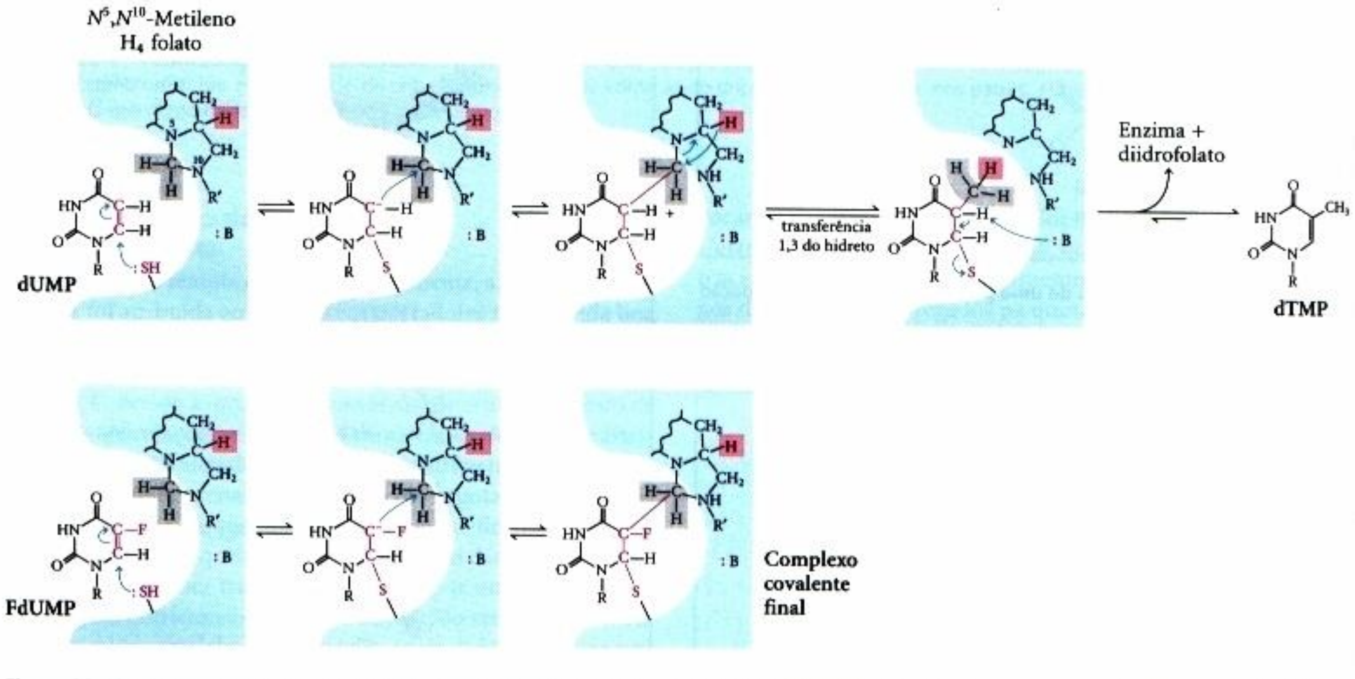

N^5,N^{10}-Metileno H_4 folato
dUMP
:B
SH
transferência 1,3 do hidreto
Enzima + diidrofolato
dTMP
FdUMP
Complexo covalente final

Figura 22-48 – Conversão do dUMP em dTMP e sua inibição por FdUMP. No alto, está representado o mecanismo normal de reação da timidilato sintase. O grupo sulfidrila nucleofílico contribuído pela enzima e os átomos de dUMP, que tomam parte na reação, estão mostrados em vermelho; :B representa uma cadeia lateral de aminoácido que age como uma base para retirar um próton no último passo. Os hidrogênios derivados do grupo metileno do N^5,N^{10}-metilenotetraidrofolato estão sombreados em cinza. Uma característica nova do mecanismo de reação da timidilato sintase (no alto) é uma transferência 1,3 do hidreto, que move um íon hidreto (sombreado em vermelho) de C-6 do H_4 folato para o grupo metila da timidina, ela resulta na oxidação do tetraidrofolato em diidrofolato. É a mudança de hidreto que aparentemente não ocorre quando o substrato é o análogo FdUMP (abaixo). Os dois primeiros passos da reação ocorrem normalmente, mas resultam em um complexo covalente estável, com o FdUMP ligado covalentemente à enzima e ao tetraidrofolato. A formação deste complexo inativa a enzima.

verte-o no desoxinucleosídeo monofosfato FdUMP, que se liga à enzima e a inativa. O mecanismo de ação do FdUMP (Fig. 22-48) representa um exemplo clássico de inativação enzimática baseada no mecanismo de reação. Outro agente quimioterápico proeminente, o **metotrexato,** é um inibidor da diidrofolato redutase. O metotrexato é um análogo do folato e age como inibidor competitivo. A enzima liga-se ao metotrexato cerca de 100 vezes melhor que no diidrofolato. A **aminopterina** também inibe a diidrofolato redutase.

O potencial médico terapêutico dos inibidores da biossíntese de nucleotídeos não está limitado ao tratamento do câncer. Todas as células em multiplicação rápida (incluindo bactérias e protistas) são alvos potenciais deles. Protistas parasitas, como os tripanossomos, que causam a doença do sono africana (tripanossomíase africana), não possuem as vias para a biossíntese "de novo" dos nucleotídeos e são particularmente sensíveis aos agentes farmacêuticos que interferem em sua obtenção de nucleotídeos do meio ambiente por meio das vias de recuperação. O alopurinol (Fig. 22-45) e um certo número de análogos da purina mostram ser promissores para o tratamento da tripanossomíase africana e de doenças relacionadas. Veja Adendo 22-2 para outra abordagem do tratamento da tripanossomíase africana, que se tornou possível pelos avanços de nossa compreensão do metabolismo e dos mecanismos de ação enzimática.

Resumo

O nitrogênio molecular representa perto de 80% da atmosfera da Terra, mas não está disponível para os organismos vivos antes de ser quimicamente reduzido. A fixação biológica do N_2 atmosférico ocorre pela ação do complexo da nitrogenase que existe em certas bactérias que vivem livremente no solo e em bactérias que vivem de forma simbiótica nos nódulos das raízes das plantas leguminosas. A formação de amônia pela fixação bacteriana do N_2, a nitrificação da amônia para formar nitrato pelos organismos do solo, a conversão do nitrato em amônia por plantas superiores, a síntese de aminoácidos a partir de amônia por todos os organismos e a conversão do nitrato em N_2 por algumas bactérias do solo no processo de desnitrificação constituem o ciclo do nitrogênio. A fixação de N_2, como a de NH_3, é realizada por um complexo protéico chamado de complexo da nitrogenase, em uma reação que requer ATP. O complexo da nitrogenase é muito lábil na presença de O_2.

Nos sistemas vivos, o nitrogênio reduzido é incorporado primeiro nos aminoácidos e em uma grande variedade de outras biomoléculas, inclusive os nucleotídeos. O ponto-chave de entrada é o aminoácido glutamato. O glutamato e a glutamina são os doadores de nitrogênio em uma grande variedade de reações biossintéticas. A glutamina sintetase, que catalisa a formação de glutamina do glutamato, é uma enzima reguladora de importância decisiva no metabolismo do nitrogênio.

As vias biossintéticas dos aminoácidos e dos nucleotídeos fazem repetido emprego dos co-fatores biológicos piridoxal fosfato, tetraidrofolato, e *S*-adenosilmetionina. O piridoxal fosfato é necessário nas reações de transaminação que envolvem o glutamato e um significativo número de outras transformações dos aminoácidos. Transferências de unidades monocarbônicas são executadas empregando *S*-adenosilmetionina (no nível de oxidação do $—CH_3$) e tetraidrofolato (usualmente nos níveis de oxidação de —CHO e $—CH_2OH$). As enzimas chamadas glutamina amidotransferases são empregadas nas reações que incorporam o nitrogênio derivado da glutamina.

Os vegetais e as bactérias sintetizam todos os 20 aminoácidos-padrão. Os mamíferos podem sintetizar 10 dos 20 aminoácidos das proteínas. Os outros 10 precisam estar presentes na alimentação dessas espécies (aminoácidos essenciais). Entre os aminoácidos não-essenciais, o glutamato é formado pela aminação redutiva do α-cetoglutarato e é o precursor da glutamina, prolina e arginina. A alanina e o aspartato e, portanto, a asparagina são formados do piruvato e do oxaloacetato, respectivamente, por transaminação. A cadeia carbônica da serina é derivada do 3-fosfoglicerato. A serina é um precursor da glicina; o átomo de carbono β da serina é transferido para o tetraidrofolato. Nos microrganismos, a cisteína é formada da serina e de sulfeto produzido por redução do sulfato do ambiente. Os mamíferos produzem a cisteína da metionina e da serina por uma série de reações que necessitam de *S*-adenosilmetionina e cistationina. Entre os aminoácidos essenciais, os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) são formados por meio de uma via na qual o intermediário corismato ocupa um ponto-chave de ramificação. O fosforribosilpirofosfato é um precursor do triptofano e da histidina. A via biossintética da histidina está interconectada com a via de síntese das purinas. A tirosina pode também ser formada por hidroxilação da fenilalanina (e, por isso, é tida como um aminoácido não-essencial). As vias para biossíntese de outros aminoácidos essenciais são complexas. As vias biossintéticas dos aminoácidos estão sujeitas à inibição alostérica pelo produto final, a enzima reguladora é, em geral, a primeira da seqüência. A regulação dessas vias sintéticas é coordenada.

Muitas outras biomoléculas importantes são derivadas dos aminoácidos. A glicina é um precursor das porfirinas. A glicina e a arginina dão origem à creatina e à fosfocreatina. A glutationa, um tripeptídeo, é um agente celular redutor muito importante. Nas bactérias, os D-aminoácidos são sintetizados dos L-aminoácidos em reações de racemização que requerem piridoxal fosfato. A descarboxilação dependente de PLP de certos aminoácidos libera importantes aminas biológicas, inclusive neurotransmissores. Os aminoácidos aromáticos são precursores de um grande número de substâncias vegetais. A arginina é a precursora do óxido nítrico, uma molécula sinalizadora muito importante.

O sistema em anel das purinas é construído passo a passo na 5-fosforribosilamina. Os aminoácidos, glutamina, glicina e aspartato, fornecem todos os átomos de nitrogênio das purinas. Para formar o núcleo da purina, são necessários dois passos de fechamento do anel. As pirimidinas são sintetizadas a partir do carbamil fosfato e do aspartato. A ribose-5-fosfato é então ligada para formar os ribonucleotídeos de pirimidina. As vias biossintéticas das purinas e das pirimidinas são reguladas por inibição por retroalimentação ("feedback"). Os nucleosídeos monofosfato são convertidos para o trifosfato respectivo por reações de fosforilação enzimática. Os ribonucleotídeos são convertidos em desoxirribonucleotídeos pela ação da ribonucleotídeo redutase, uma enzima com notáveis características reguladoras e de mecanismo de ação. Os nucleotídeos de timina são derivados dos desoxirribonucleotídeos dCDP e dUMP. O ácido úrico e a uréia são os produtos finais da degradação das purinas e das pirimidinas. As purinas livres podem ser recuperadas e reconstruídas em nucleotídeos por uma via separada. As deficiências genéticas, em certas enzimas de recuperação, provocam doenças genéticas sérias, tais como a síndrome de Lesch-Nyhan e uma doença de imunodeficiência severa. Outra possível deficiência genética resulta na deposição de cristais do ácido úrico nas articulações ósseas, causando a gota. As enzimas das vias de biossíntese dos nucleotídeos são alvos para um conjunto de agentes quimioterápicos modernos empregados no tratamento do câncer e de outras doenças.

Leitura Adicional

Fixação do nitrogênio

Burris RH. (1991) Nitrogenases. *J. Biol. Chem.* **266**, 9339-9342.

Um sumário curto e bem escrito.

Howard JB & Rees DC. (1994) Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 235-264.

Leigh GJ. (1995) The mechanism of dinitrogen reduction by molibdenium nitrogenases. *Eur. J. Biochem.* **229**, 14-20.

Vias biossintéticas dos aminoácidos

Abeles RH, Frey PA, & Jencks WP. (1992) *Biochemistry*, Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Esse livro inclui um excelente estudo dos mecanismos de reação, incluindo o metabolismo das unidades monocarbônicas e das enzimas dependentes de piridoxal fosfato.

Bender DA. (1985) *Amino Acid Metabolism*, 2nd edn, Wiley-Interscience, New York.

Crane BR, Siegel LM, & Getzoff EE. (1995) Sulfite reductase structure at 1.6Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. *Science* **270**, 59-67.

Pan P, Woehl E, & Dunn MF. (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 22-27.

Compostos derivados dos aminoácidos

Bredt DS & Snyder SH. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* **63**, 175-195.

Meister A & Anderson ME. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.

Rondon MR, Trzebiatowski JR, & Escalante-Semerena JC. (1997) Biochemistry and molecular genetics of cobalamin biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **56**, 347-384.

Stadtman TC. (1996) Selenocysteine *Annu. Rev. Bioch.* **65**, 83-100.

Biossíntese dos nucleotídeos

Benkovic SJ. (1980) On the mechanism of action of folate- and biopterin-requiring enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 227-251.

Blakley RL & Benkovic SJ. (1985) *Folates and Pterins*, Vol. 2: *Chemistry and Biochemistry of Pterins*, Wiley-Interscience, New York.

Carreras CW & Santi SJ. (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 721-762.

Daubner SC, Schrimsher JL, Schendel FJ, Young M, Henikoff S, Patterson D, Stubbe J, & Benkovic SJ. (1985) A multifunctional protein possessing glycinamide ribonucleotide synthetase, glycinamide ribonucleotide transformylase, and aminoimidazole ribonucleotide synthetase activities in *de novo* purine biosynthesis. *Biochemistry* **24**, 7059-7062.

Eliasson R, Pontis E, Sun X, & Reichard P. (1994) Allosteric control of the substrate specifity of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26052-26057.

Hardy LW, Finer-Moore JS, Montfort WR, Jones MO, Santi DV, & Stroud RM. (1987) Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design. *Science* **235**, 448-455.

Holmgren A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**, 13963-13966.

Jones ME. (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 253-279.

Jordan A & Reichard P. (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 71-98.

Kornberg A & Baker TA. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Esse texto inclui um resumo atualizado da biossíntese dos nucleotídeos.

Lee L, Kelly RE, Pastra-Landis SC, & Evans DR. (1985) Oligomeric structure of the multifunctional protein CAD that initiates pyrimidine biosynthesis in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6802-6806.

Licht S, Gerfen GJ, & Stubbe J. (1996) Tihyl radicals in ribonucleotide reductase. *Science* **271**, 477-481.

Mueller EJ, Meyer E, Rudolph J, Davisson VJ, & Stubbe J. (1994) N^5-carboxyaminoimidazole ribonucletide: evidence for a new intermediate and two new enzymatic activities in the de novo purine biosyntetic pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 2269-2278.

Stubbe J & Riggs-Gelasco P. (1998) Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 438-433.

Villafranca JE, Howell EE, Voet DH, Strobel MS, Ogden RC, Abelson JN, & Kraut J. (1983) Directed mutagenesis of dihydrofolate reductase. *Science* **222**, 782-788.

Estudos estruturais sobre essa importante enzima.

Doenças genéticas

Scriver CR, Beandet AL, Sly WS, & Valle D. (eds) (1995) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 7th edn, McGraw-Hill Inc., New York.

Esse livro tem bons capítulos sobre os distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, porfirinas e do grupo heme. Veja também os capítulos sobre os erros genéticos no metabolismo das purinas e pirimidinas.

Problemas

1. Consumo de ATP pelos nódulos das raízes das leguminosas. As bactérias que habitam os nódulos das raízes do pé de ervilha consomem mais de 20% de todo o ATP produzido pela planta. Sugira uma razão do porquê essas bactérias consomem tanto ATP.

2. A síntese de proteínas e a glutamato desidrogenase. A bactéria *Methylophilus methylotrophus* pode sintetizar proteínas a partir de metanol e amônia. Técnicas de DNA recombinante melhoraram o rendimento de proteína introduzindo na *M. methylotrophus* o gene da *E. coli* para a glutamato desidrogenase. Por que essa manipulação genética aumenta o rendimento de proteína?

3. A transformação do aspartato em asparagina. Existem duas vias de transformação do aspartato em asparagina com gasto de ATP. Muitas bactérias possuem uma asparagina sintetase que usa o íon amônio como doador de nitrogênio. Os mamíferos possuem uma asparagina sintetase que usa glutamina como doador de nitrogênio. Como esta última requer uma molécula de ATP extra (para a síntese da glutamina), por que os mamíferos usam essa via?

4. Equação para a síntese de aspartato a partir da glicose. Escreva a equação líquida para a síntese do aminoácido não-essencial aspartato a partir da glicose, do dióxido de carbono e da amônia.

5. O defeito na fenilalanina hidroxilase e a dieta. Nos indivíduos normais, a tirosina é um aminoácido não-essencial; entretanto, pacientes que apresentam um defeito genético na fenilalanina hidroxilase requerem tirosina na sua dieta para o crescimento normal. Explique.

6. Co-fatores para as reações de transferência de unidades monocarbônicas. A maioria das reações de transferência de unidades monocarbônicas utiliza um de três co-fatores: biotina, tetraidrofolato ou *S*-adenosilmetionina (Capítulo 18). A *S*-adenosilmetionina é empregada como um doador de grupos metila na maioria dessas reações, pois o potencial de transferência do grupo metila no N^5-metiltetraidrofolato é insuficiente para a maioria das reações biossintéticas. Entretanto, um exemplo do emprego do N^5-metiltetraidrofolato na transferência de um grupo metila ocorre na reação da metionina sintase (passo ⑨ na Fig. 22-15) e a metionina é um precursor imediato da *S*-adenosilmetionina (veja Fig. 18-17). Explique como o grupo metila da *S*-adenosilmetionina pode ser derivado do N^5-metiltetraidrofolato, quando se sabe que o potencial de transferência do grupo metila no N^5-metiltetraidrofolato é 10^3 vezes *menor* que o mesmo da *S*-adenosilmetionina.

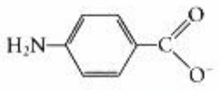
7. Regulação concertada da biossíntese de aminoácidos. A glutamina sintetase da *E. coli* é modulada independentemente por vários produtos do metabolismo da glutamina (veja Fig. 22-6). Nessa inibição concertada, a extensão da inibição da enzima é maior que a simples soma das inibições provocadas por cada produto. Para a *E. coli*, que se multiplica em um meio rico em histidina, qual seria a vantagem conferida pela inibição concertada?

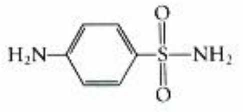
8. Relação entre deficiência em ácido fólico e anemia. A deficiência em ácido fólico, acreditada ser a deficiência vitamínica mais comum, provoca um tipo de anemia na qual a síntese de hemoglobina está prejudicada e os eritrócitos não amadurecem adequadamente. Qual é a relação metabólica entre a síntese de hemoglobina e a deficiência em ácido fólico?

9. Biossíntese dos nucleotídeos em bactérias auxotróficas de aminoácidos. Embora as células normais da *E. coli* possam sintetizar todos os aminoácidos, algumas mutantes, chamadas de auxotróficas, são incapazes de sintetizar aminoácidos específicos e requerem a adição daquele aminoácido ao meio de cultura para o crescimento ótimo. Além do seu papel na síntese das proteínas, aminoácidos específicos são também necessários na biossíntese de outros produtos celulares nitrogenados. Considere três auxotróficos de aminoácidos incapazes de sintetizar glicina, glutamina e aspartato. Para cada mutante, que outros produtos nitrogenados celulares, além das proteínas, não poderiam ser sintetizados?

10. Inibidores da biossíntese de nucleotídeos. Sugira mecanismos para a inibição de (a) alanina racemase por L-fluoroalanina; e (b) glutamina amidotransferases por azasserina.

11. Modo de ação das sulfas. Algumas bactérias requerem a inclusão de *p*-aminobenzoato no meio de cultura para o crescimento normal. O crescimento de tais bactérias é gravemente inibido pela adição da sulfanilamida, uma das primeiras sulfas antibacterianas. Além disso, na sua presença, o 5'-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR; veja Fig. 22-31) acumula-se no meio de cultura. Ambos os efeitos são revertidos pela adição de excesso de *p*-aminobenzoato.


p-Aminobenzoato


Sulfanilamida

(a) Qual é o papel do ácido *p*-aminobenzoato? (Indicação: veja a Fig. 18-15).

(b) Por que o AICAR se acumula na presença da sulfanilamida?

(c) Por que a inibição e o acúmulo são revertidos pela adição de excesso de *p*-aminobenzoato?

12. Via do carbono na biossíntese das pirimidinas. Preveja as posições do ^{14}C na molécula do orotato biossintetizado em células crescidas na presença de pequenas quantidades de $[^{14}C]$succinato uniformemente marcado? Explique.

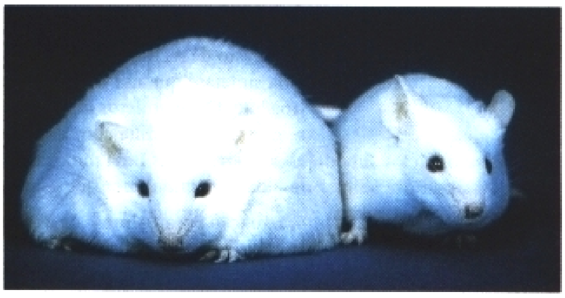
13. Os nucleotídeos são fontes pobres de energia. Sob condições de subnutrição ou jejum, os organismos podem usar proteínas e aminoácidos como fontes de energia. A desaminação dos aminoácidos fornece esqueletos carbônicos que podem entrar na via glicolítica ou no ciclo do ácido cítrico para liberar energia na forma de ATP. Entretanto, os nucleotídeos não são degradados de forma similar para emprego como fornecedores de energia. Quais observações sobre a fisiologia celular suportam essa afirmação? Qual aspecto da estrutura molecular dos nucleotídeos faz deles uma fonte de energia relativamente pobre?

14. Tratamento da gota. O alopurinol (veja Fig. 22-45), um inibidor da xantina oxidase, é usado para tratar a gota crônica. Explique as bases bioquímicas desse tratamento. Os pacientes tratados com alopurinol, algumas vezes, desenvolvem pedras de xantina nos rins, embora a incidência de lesões renais seja muito menor nesses casos do que na gota não-tratada. Explique essa observação considerando as seguintes solubilidades na urina: ácido úrico 0,15g/L, xantina 0,05g/L e hipoxantina 1,4g/L.

15. Inibição da síntese dos nucleotídeos pela azasserina. O diazo composto *O*-(2-diazoacetil)-L-serina, conhecido também como azasserina (veja Fig. 22-46), é um poderoso inibidor da glutamina amidotransferases. Se as células que estão em processo de multiplicação são tratadas com a azasserina, quais intermediários nas vias de biossíntese dos nucleotídeos se acumularão? Explique.

CAPÍTULO 23

Integração e Regulação Hormonal do Metabolismo dos Mamíferos



Estes dois camundongos são da mesma idade e têm a mesma constituição genética, exceto que o da esquerda apresenta um defeito genético na produção de um hormônio (leptina), que regula o comportamento alimentar e a atividade metabólica. Como conseqüência, o camundongo com deficiência desse hormônio acumula enorme reserva de triacilgliceróis no tecido adiposo. Neste capítulo, serão descritos os mecanismos hormonais que coordenam e integram as atividades metabólicas de todos os tecidos para promover a homeostasia no animal.

Nos Capítulos 14 a 22, discutimos o metabolismo em termos da célula individual, enfatizando aquelas vias comuns a quase todas as células, procarióticas e eucarióticas. Vimos como os processos metabólicos, nas células isoladas, são regulados no nível das enzimas individuais pela disponibilidade de substrato, por mecanismos alostéricos e/ou por fosforilação ou outras modificações covalentes das moléculas das enzimas.

Para apreciar inteiramente o significado das vias metabólicas individuais e sua regulação, precisamos examiná-las no contexto do organismo inteiro. Uma característica essencial dos organismos multicelulares é a diferenciação celular e a divisão de trabalho. Além das vias centrais do metabolismo produtor de energia, que ocorrem em todas as células, os tecidos e os órgãos de organismos complexos como o homem possuem funções especializadas. Estas apresentam requerimentos energéticos e padrões de metabolismo característicos. Sinais hormonais integram e coordenam as atividades metabólicas dos diferentes tecidos e realizam a alocação otimizada de combustíveis e precursores para cada órgão. Neste capítulo o enfoque é sobre os mamíferos, salientando o metabolismo especializado de vários dos principais órgãos e tecidos e a integração do metabolismo do organismo inteiro.

Começamos examinando a distribuição dos nutrientes aos vários órgãos — na qual o fígado desempenha um papel central — e a cooperação metabólica entre esses órgãos. Para ilustrar o papel integrativo dos hormônios, descrevemos a inter-relação da adrenalina, glucagon e insulina na coordenação do metabolismo energético no músculo, fígado e tecido adiposo. As alterações metabólicas no diabetes mostram ainda mais a importância da regulação hormonal do metabolismo. Em seguida, estendemos nossa discussão, incluindo a grande variedade de tipos de hormônios e suas ações em outros processos além do metabolismo energético. Finalmente, apresentamos a regulação a longo prazo da massa corporal.

Metabolismo Tecido-Específico: A Divisão de Trabalho

Cada tecido e órgão do corpo humano possui uma função especializada que é refletida na sua anatomia e na atividade metabólica. O músculo esquelético permite o movimento direcionado; o tecido adiposo armazena e libera gorduras, que servem como combustível para o corpo inteiro; o cérebro bombeia íons para produzir sinais elétricos. O fígado desempenha um papel central no metabolismo, processando, distribuindo e fornecendo uma mistura de nutrientes para todos os outros órgãos e tecidos através da corrente sangüínea. A centralidade funcional do fígado é indicada pela referência comum a todos os outros órgãos e tecidos como "extra-hepáticos" ou "periféricos". Começamos, portanto, nossa discussão sobre a divisão de trabalho metabólico considerando as transformações dos carboidratos, aminoácidos e gorduras no fígado dos mamíferos. Isso é seguido por descrições curtas das principais funções metabólicas do tecido adiposo, músculo, cérebro e tecido que interconecta todos os outros: o sangue.

O fígado processa e distribui nutrientes

Durante a digestão nos mamíferos, as três principais classes de nutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) sofrem hidrólise enzimática nas suas subunidades monoméricas. Essa quebra é necessária porque as células epiteliais que cobrem a luz intestinal são capazes de absorver apenas moléculas relativamente simples. Muitos dos ácidos graxos e monoacilgliceróis liberados pela digestão no intestino são reconvertidos dentro das células epiteliais em triacilgliceróis.

Depois de serem absorvidos, a maioria dos açúcares e aminoácidos e alguns triacilgliceróis passam para o sangue, sendo captados pelos hepatócitos no fígado; os triacilgliceróis remanescentes entram no tecido adiposo via sistema linfático. Os hepatócitos transformam os nutrientes obtidos da dieta em combustíveis e precursores requeridos por outros tecidos e os exportam para o sangue. As espécies e as quantidades de nutrientes supridos pelo fígado variam com vários fatores, incluindo a dieta e o intervalo de tempo entre as refeições. A demanda dos tecidos extra-hepáticos por combustíveis e precursores varia entre os órgãos e com a atividade do organismo. Para satisfazer essas circunstâncias mutáveis, o fígado possui admirável flexibilidade metabólica. Por exemplo, quando a dieta é rica em proteínas, os hepatócitos contêm altos níveis de enzimas para o catabolismo dos aminoácidos e a gliconeogênese. Horas após uma mudança para uma dieta rica de carboidratos, os níveis dessas enzimas caem e inicia-se a síntese das enzimas essenciais para o metabolismo dos carboidratos. Outros tecidos também ajustam o seu metabolismo às condições prevalentes, mas nenhum é tão adaptável como o fígado, e nenhum é tão central para as atividades metabólicas gerais do organismo. O que se segue é um resumo dos destinos possíveis dos açúcares, aminoácidos e lipídios que entram no fígado a partir da corrente sangüínea. Para ajudar a relembrar as transformações metabólicas discutidas aqui, a Tabela 23-1 mostra as principais vias e processos aos quais nos referiremos e indica a Figura na qual cada via é apresentada em detalhe.

Açúcares. O transportador de glicose nos hepatócitos (GluT2) é tão eficiente que a concentração de glicose dentro do hepatócito é essencialmente a mesma do sangue. A glicose que entra nos hepatócitos é fosforilada pela glicoquinase produzindo a glicose-6-fosfato. A glicoquinase tem um K_m para a glicose (10mM) muito maior que a hexoquinase (pág. 430); diferente da hexoquinase, não é inibida por seu produto, a glicose-6-fosfato. A presença da glicoquinase permite que os hepatócitos continuem a fosforilar a glicose quando a concentração da hexose aumenta muito acima dos níveis que poderiam inibir a hexoquinase. A frutose, a galactose e a manose absorvidas no intestino delgado são também convertidas em glicose-6-fosfato pelas vias enzimáticas examinadas anteriormente. A glicose-6-fosfato está em um cruzamento de vias do metabolismo dos carboidratos no fígado. Ela pode tomar qualquer uma das cinco principais vias metabólicas (Fig. 23-1), dependendo das necessidades

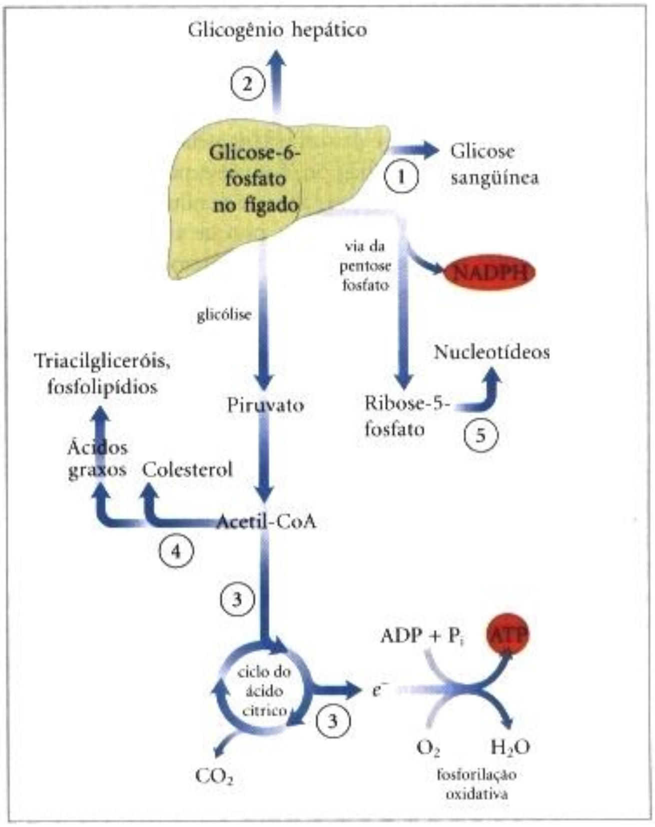


Figura 23-1 – Vias metabólicas para a glicose-6-fosfato no fígado. Aqui e nas figuras seguintes, as vias anabólicas são mostradas apontando para cima, as catabólicas, para baixo, e a distribuição a outros órgãos, horizontalmente. Os processos numerados correspondem à descrição no texto.

Tabela 23-1 – Vias do metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e gorduras mostradas em figuras anteriores

Vias	Referência da figura
Ciclo do ácido cítrico: acetil-CoA ⟶ $2CO_2$	16-7
Fosforilação oxidativa: síntese do ATP	19-16
Catabolismo dos carboidratos	
Glicogenólise: glicogênio ⟶ glicose-1-fosfato ⟶ glicose sangüínea	15-11
Entrada de hexoses na glicólise: frutose, manose, galactose ⟶ glicose-6-fosfato	15-11
Glicólise: glicose ⟶ piruvato	15-2
Reação da piruvato desidrogenase: piruvato ⟶ acetil-CoA	16-2
Fermentação do ácido láctico: glicogênio ⟶ lactato + 2ATP	15-3
Via das pentoses fosfato: glicose-6-fosfato ⟶ pentoses fosfato + NADPH	15-20
Anabolismo dos carboidratos	
Gliconeogênese: intermediários do ciclo do ácido cítrico ⟶ glicose	20-2
Ciclo glicose-alanina: glicose ⟶ piruvato ⟶ alanina ⟶ glicose	18-8
Síntese do glicogênio: glicose-6-fosfato ⟶ glicose-1-fosfato ⟶ glicogênio	20-12
Metabolismo dos aminoácidos e nucleotídeos	
Degradação dos aminoácidos: aminoácidos ⟶ acetil-CoA, intermediários do ciclo do citrato	18-29
Síntese dos aminoácidos	22-9
Ciclo da uréia: NH_3 ⟶ uréia	18-9
Ciclo glicose-alanina: alanina ⟶ glicose	18-8
Síntese dos nucleotídeos: aminoácidos ⟶ purinas, pirimidinas	22-31; 22-34
Síntese dos hormônios e neurotransmissores	22-27
Catabolismo das gorduras	
β-Oxidação dos ácidos graxos: ácidos graxos ⟶ acetil-CoA	17-8
Oxidação dos corpos cetônicos: β-hidroxibutirato ⟶ acetil-CoA ⟶ CO_2	17-17
Anabolismo das gorduras	
Síntese dos ácidos graxos: acetil-CoA ⟶ ácidos graxos	21-5
Síntese dos triacilgliceróis: acetil-CoA ⟶ ácidos graxos ⟶ triacilglicerol	21-18; 21-19
Formação dos corpos cetônicos: acetil-CoA ⟶ acetoacetato, β-hidroxibutirato	17-16
Síntese do colesterol e ésteres do colesterol: acetil-CoA ⟶ colesterol ⟶ ésteres do colesterol	21-32 a 21-36
Síntese dos fosfolipídios: ácidos graxos ⟶ fosfolipídios	21-27

do organismo. Pela ação de várias enzimas reguladas alostericamente e por meio da regulação hormonal da síntese e da atividade das enzimas, o fluxo de glicose é direcionado para uma ou mais dessas vias no fígado.

① A glicose-6-fosfato é desfosforilada pela glicose-6-fosfatase produzindo glicose livre (pág. 567), que é exportada para repor a glicose sangüínea. A exportação é a via de escolha quando a quantidade de glicose-6-fosfato é limitada, porque a concentração da glicose sangüínea deve ser mantida suficientemente alta (4mM) para fornecer energia adequada para o cérebro e outros tecidos. ② A glicose-6-fosfato não imediatamente necessária para formar a glicose sangüínea é convertida em glicogênio hepático. ③ A glicose-6-fosfato pode ser oxidada para a produção de energia via glicólise, descarboxilação do piruvato (pela reação da piruvato desidrogenase) e ciclo do ácido cítrico. A transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa que se seguem produzem ATP (normalmente, entretanto, os ácidos graxos são o combustível preferido para a produção de energia nos hepatócitos). ④ O excesso de glicose-6-fosfato não usado para sintetizar a glicose sangüínea ou o glicogênio hepático é degradado via glicólise e reação da piruvato desidrogenase em acetil-CoA, que serve como precursor para a síntese de lipídios: ácidos graxos, que são incorporados em triacilgliceróis, fosfolipídios e colesterol. Muito do lipídio sintetizado no fígado é exportado para outros tecidos e transportado por lipoproteínas sangüíneas. ⑤ Finalmente, a glicose-6-fosfato é o substrato para a via da pentose fosfato, produzindo tanto o poder redutor (NADPH), necessário para a biossíntese dos ácidos graxos e colesterol, quanto a D-ribose-5-fosfato, um precursor na biossíntese dos nucleotídeos.

Aminoácidos. Os aminoácidos que entram no fígado possuem várias vias metabólicas importantes (Fig. 23-2). ① Eles agem como precursores para a síntese de proteínas nos hepatócitos, um processo discutido no Capítulo 27. O fígado constantemente renova suas próprias proteínas, que possuem uma velocidade de degradação muito alta, com uma meia-vida de apenas alguns dias. O fígado é também o local da biossíntese da maioria das proteínas plasmáticas do sangue. ② Alternativamente, os aminoácidos passam do fígado para o sangue e daí para outros órgãos, para ser usados como precursores na síntese das proteínas teciduais. ③ Certos aminoácidos são precursores na biossíntese dos nucleotídeos, hormônios e outros compostos nitrogenados no fígado e em outros tecidos.

④ Os aminoácidos não necessários como precursores biossintéticos são deaminados e degradados para produzir acetil-CoA e intermediários do ciclo do ácido cítrico. Os intermediários do ciclo do ácido cítrico assim formados podem ser convertidos em glicose e glicogênio pela via gliconeogênica (4a). O acetil-CoA pode ser oxidado por meio do ciclo do ácido cítrico para produzir a energia do ATP (4b), ou pode ser convertido em lipídios para armazenamento (4c). A amônia liberada na degradação dos aminoácidos é convertida pelos hepatócitos no produto de excreção, a uréia (4d).

O fígado também participa no metabolismo dos aminoácidos que chegam intermitentemente dos tecidos periféricos. O sangue é adequadamente suprido com glicose logo após a digestão e a absorção dos carboidratos da dieta ou, entre as refeições, pela conversão do glicogênio hepático em glicose sangüínea. Durante o período entre as refeições, especialmente se prolon-

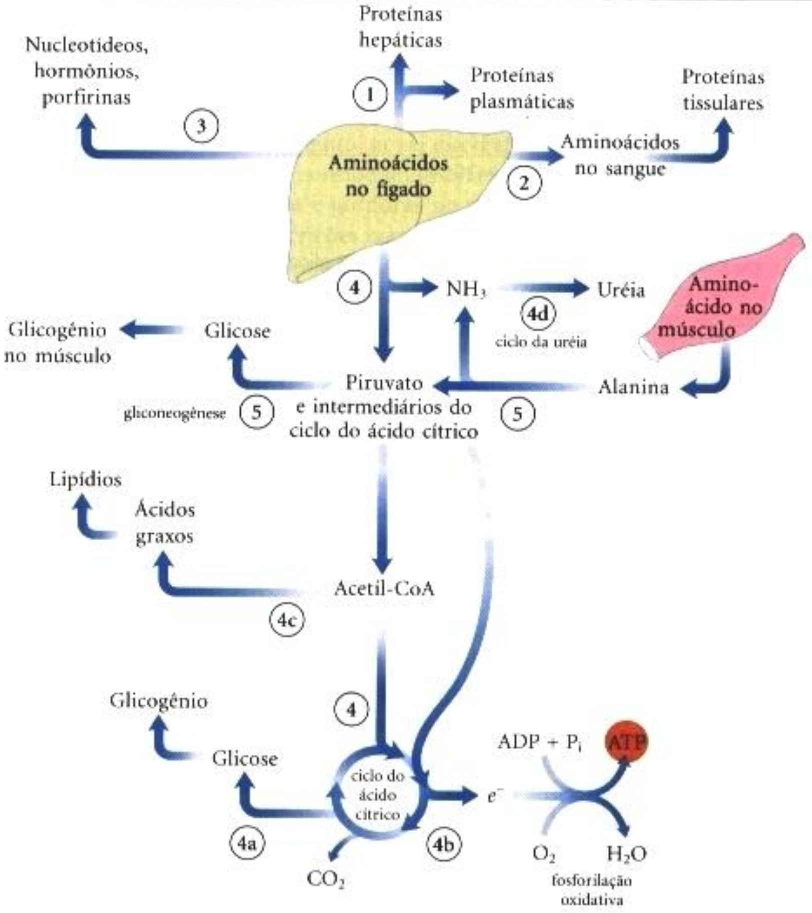

Proteínas hepáticas
Nucleotídeos, hormônios, porfirinas
①
Proteínas plasmáticas
Proteínas tissulares
③
Aminoácidos no fígado
Aminoácidos no sangue
②
④
NH₃
Uréia
(4d)
ciclo da uréia
Amino-ácido no músculo
Glicogênio no músculo
Glicose
Piruvato e intermediários do ciclo do ácido cítrico
Alanina
gliconeogênese
⑤
⑤
Lipídios
Ácidos graxos
Acetil-CoA
(4c)
Glicogênio
④
Glicose
ciclo do ácido cítrico
ADP + Pᵢ
ATP
e⁻
(4a)
(4b)
CO₂
O₂
H₂O
fosforilação oxidativa

Figura 23-2 – Metabolismo dos aminoácidos no fígado

gado, há alguma degradação de proteínas musculares em aminoácidos ⑤. Esses aminoácidos doam seus grupos amino (por transaminação) ao piruvato, o produto da glicólise, produzindo alanina, que é transportada para o fígado e deaminada. O piruvato resultante é convertido pelos hepatócitos em glicose sangüínea (via gliconeogênese), e a NH_3 é convertida em uréia para a excreção. A glicose retorna aos músculos esqueléticos para repor as reservas de glicogênio muscular. Um benefício desse processo cíclico, o ciclo da alanina-glicose (veja Fig. 18-8), é a atenuação das flutuações na glicose sangüínea no período entre as refeições. O déficit de aminoácidos adquirido nos músculos é reposto após a refeição seguinte pelos aminoácidos que chegam pela dieta.

Lipídios. Os ácidos graxos componentes dos lipídios que entram nos hepatócitos também possuem diferentes caminhos (Fig. 23-3). ① Os ácidos graxos são convertidos em lipídios do fígado. ② Na maioria das circunstâncias, os ácidos graxos são os principais combustíveis oxidativos no fígado. Os ácidos graxos livres podem ser ativados e oxidados para produzir acetil-CoA e NADH. O acetil-CoA é oxidado por meio do ciclo do ácido cítrico produzindo ATP pela fosforilação oxidativa. ③ O excesso de acetil-CoA liberado na oxidação dos ácidos graxos e não requerido pelo fígado é convertido em corpos cetônicos, acetoacetato e β-hidroxibutirato, que circulam no sangue até os tecidos periféricos, para ser usados como combustível no ciclo do ácido cítrico. Os corpos cetônicos podem ser considerados como uma forma de transporte de grupos acetila. Durante o jejum prolongado, eles podem suprir uma fração significante da energia em alguns tecidos periféricos, até um terço no coração e de 60 a 70% no cérebro. ④ Parte do acetil-CoA proveniente dos ácidos graxos (e da glicose) é usada para a biossíntese do colesterol, que é necessária para a biossíntese das membranas. O colesterol é também precursor de todos os hormônios esteróides e dos sais biliares, que são essenciais para a digestão e a absorção dos lipídios.

Os dois destinos metabólicos finais dos lipídios envolvem mecanismos especializados no transporte de lipídios insolúveis no sangue. ⑤ Os ácidos graxos são convertidos em fosfolipídios e triacilgliceróis das lipoproteínas do plasma, os quais transportam lipídios para o tecido adiposo (gorduroso) para armazenamento como triacilgliceróis. O colesterol e os colesteril ésteres são também transportados como lipoproteínas. ⑥ Parte dos ácidos graxos torna-se ligada à soroalbumina, sendo transportada no sangue para o coração e para os músculos esqueléticos, que absorvem e oxidam os ácidos graxos livres como combustível principal. A soroalbumina é a proteína plasmática mais abundante; uma molécula de soroalbumina pode transportar até 10 moléculas de ácidos graxos livres, liberando-as no tecido consumidor em que são captadas por difusão passiva.

Dessa forma, o fígado funciona como o centro distribuidor do organismo: exportando nutrientes em proporções corretas para os outros órgãos, atenuando as flutuações no metabolismo causadas pela natureza intermitente da ingestão alimentar e processando o excesso de grupos amino na uréia e em outros produtos a ser eliminados pelos rins. O fígado é também ativo na desintoxicação de compostos orgânicos estranhos como drogas, aditivos alimentares, preservativos e outros agentes possivelmente perigosos e sem valor alimentar. A desintoxicação usualmente envolve a hidroxilação, dependente de citocromo P-450, de compostos orgânicos relativamente insolúveis, tornando-os suficientemente solúveis para posterior degradação e excreção (veja Adendo 21-1).

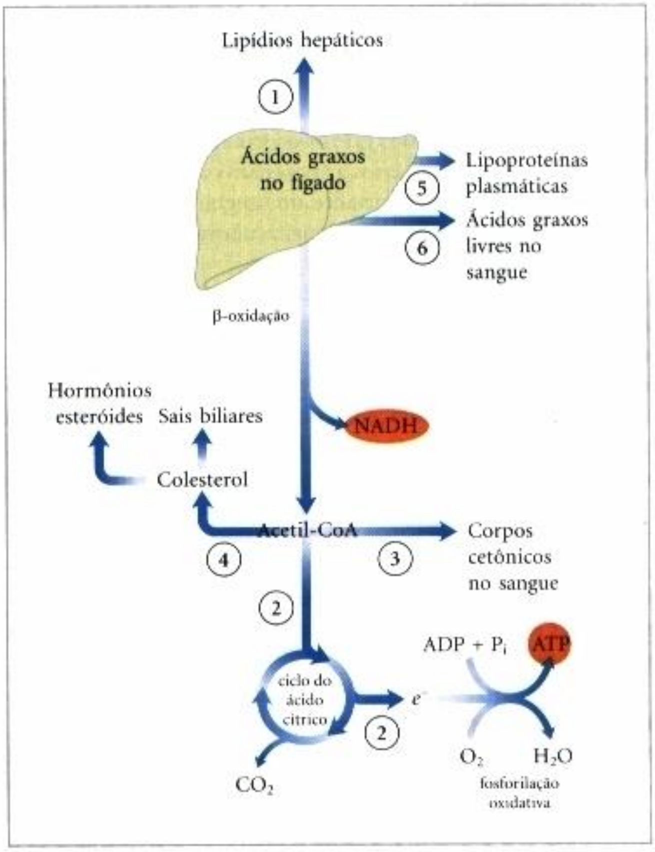


Figura 23-3 – Metabolismo dos ácidos graxos no fígado.

O tecido adiposo armazena e fornece ácidos graxos

O tecido adiposo, que consiste de adipócitos (células gordurosas; Fig. 23-4), é amorfo e largamente distribuído no organismo: sob a pele, ao redor dos vasos sangüíneos profundos e na cavidade abdominal. Ele perfaz cerca de 15% da massa de um homem adulto jovem, com aproximadamente 65% dessa massa estando na forma de triacilgliceróis. Os adipócitos são metabolicamente muito ativos, respondendo rapidamente ao estímulo hormonal em uma ação metabólica conjunta com o fígado, músculos esqueléticos e coração.

Como outros tipos celulares no organismo, os adipócitos possuem um metabolismo glicolítico ativo, usam o ciclo do ácido cítrico para oxidar piruvato e ácidos graxos e realizar a fosforilação oxidativa mitocondrial. Durante períodos de alta inges-

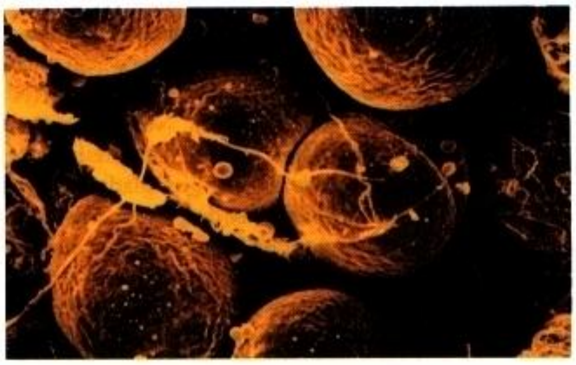


Figura 23-4 – Eletromicrografia de varredura dos adipócitos humanos. Os capilares e as fibras de colágeno formam uma rede de suporte ao redor dos adipócitos nos tecidos gordurosos. Quase todo o volume destas células metabolicamente ativas é preenchido por gotículas de gordura. A ampliação é de 440x.

tão de carboidratos, o tecido adiposo pode converter a glicose, por meio do piruvato e acetil-CoA, em ácidos graxos, a partir dos quais os triacilgliceróis são sintetizados e armazenados como grandes glóbulos gordurosos. No homem, entretanto, a maior parte da síntese dos ácidos graxos ocorre nos hepatócitos e não nos adipócitos. Os adipócitos armazenam os triacilgliceróis que chegam do fígado (transportados no sangue como VLDLs; veja Fig. 21-38a) e do trato intestinal, particularmente após refeições ricas em gorduras.

Quando há necessidade de combustível, os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são hidrolisados pelas lipases dentro dos adipócitos para liberar ácidos graxos livres, que podem então ser entregues, via corrente sangüínea, para os músculos esqueléticos e o coração. A liberação dos ácidos graxos dos adipócitos é intensamente acelerada pelo hormônio adrenalina, que estimula a ativação da lipase dos triacilgliceróis (veja Fig. 17-3). A insulina contrabalança esse efeito da adrenalina, diminuindo a atividade da lipase dos triacilgliceróis.

O homem e muitos animais, particularmente aqueles que hibernam, possuem tecido adiposo chamado de gordura marrom, que é especializado em gerar calor em vez de ATP durante a oxidação dos ácidos graxos.

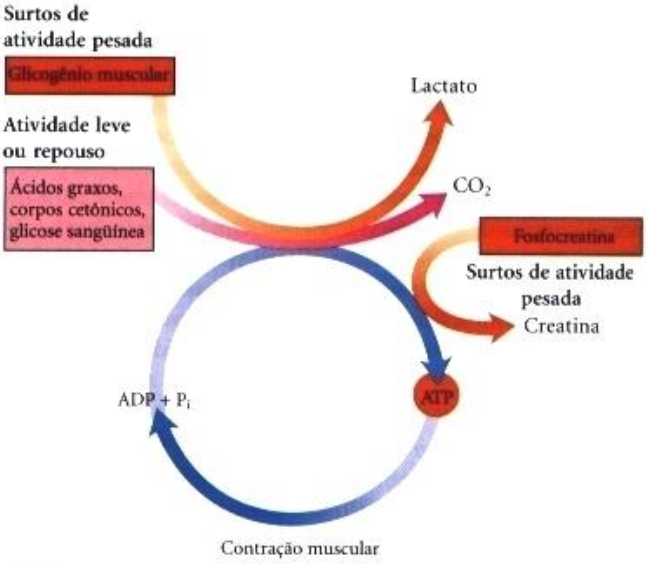

Surtos de atividade pesada
Glicogênio muscular
Lactato
Atividade leve ou repouso
Ácidos graxos, corpos cetônicos, glicose sangüínea
CO_2
Fosfocreatina
Surtos de atividade pesada
Creatina
ADP + P_i
ATP
Contração muscular

Figura 23-5 – Fontes de energia para a contração muscular. Diferentes combustíveis são usados para a síntese de ATP durante surtos de atividade pesada e durante atividades leves ou repouso. O ATP pode ser obtido rapidamente da fosfocreatina.

Os músculos usam o ATP para o trabalho mecânico

O músculo esquelético responde por mais de 50% do O_2 total consumido por um homem em repouso e cerca de 90% durante um trabalho muscular muito ativo. O metabolismo no músculo esquelético é especializado principalmente em produzir ATP como fonte imediata de energia. Além disso, o músculo esquelético está adaptado para realizar trabalho mecânico de uma maneira intermitente, sob demanda. Algumas vezes, o músculo esquelético realiza muito trabalho em um período curto, como em uma corrida de 100m; outras vezes, é necessário um trabalho mais prolongado, como na corrida da maratona ou durante o parto.

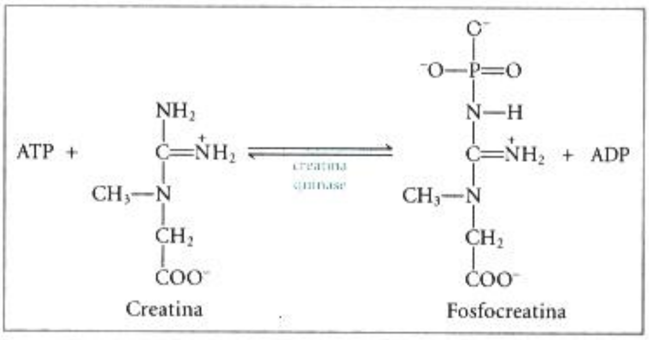
Os músculos podem usar ácidos graxos, corpos cetônicos e glicose como combustível, dependendo do grau da atividade muscular (Fig. 23-5). No músculo em repouso, os principais combustíveis são os ácidos graxos do tecido adiposo e os corpos cetônicos do fígado. Eles são oxidados e degradados em acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico para oxidação até CO_2. A resultante transferência de elétrons para o O_2 fornece energia para a síntese do ATP, pela fosforilação oxidativa. Músculos moderadamente ativos usam a glicose sangüínea além dos ácidos graxos e corpos cetônicos. A glicose é fosforilada, depois degradada pela glicólise até piruvato, que é convertido em acetil-CoA e oxidado por meio do ciclo do ácido cítrico.

Entretanto, nos músculos excessivamente ativos, a demanda por ATP é tão grande que o fluxo sangüíneo não consegue fornecer O_2 e combustível suficientes para produzir o ATP necessário apenas pela respiração aeróbica. Nessas condições, o glicogênio muscular armazenado é degradado até lactato pela fermentação. Cada unidade de glicose degradada fornece três moléculas de ATP porque a fosforólise do glicogênio produz glicose-6-fosfato, economizando o ATP normalmente consumido na reação da hexoquinase. A fermentação do ácido láctico fornece então, rapidamente, a energia extra de ATP, suplementando a produção basal de ATP resultante da oxidação aeróbica de outros combustíveis por meio do ciclo do ácido cítrico. O uso da glicose sangüínea e do glicogênio muscular como combustíveis emergenciais da atividade muscular é intensamente aumentado pela secreção da adrenalina, que estimula a formação da glicose sangüínea a partir do glicogênio no fígado e a degradação do glicogênio no tecido muscular. O músculo esquelético não contém glicose-6-fosfatase e não pode converter a glicose-6-fosfato em glicose livre para a exportação para outros tecidos. Conseqüentemente, o glicogênio muscular é completamente dedicado ao fornecimento da energia ao músculo, por meio da glicólise.

Pelo fato de os músculos esqueléticos armazenarem relativamente pouco glicogênio (cerca de 1% do seu peso total), há um limite para a quantidade de energia glicolítica disponível durante um esforço máximo. Além disso, o acúmulo de lactato e a conseqüente diminuição do pH, que ocorre nos músculos ativos no seu máximo, reduzem a sua eficiência.

Depois de um período de atividade muscular intensa, a respiração continua forte por algum tempo. Muito do O_2 obtido dessa forma é usado para a produção de ATP pela fosforilação oxidativa no fígado. Esse ATP é usado para a gliconeogênese a partir do lactato, transportado no sangue dos músculos até o fígado. A glicose assim formada retorna aos músculos para recompor o seu glicogênio, completando o ciclo de Cori (Fig. 23-6; veja também Adendo 15-1).

Os músculos esqueléticos contêm 10-30mM de fosfocreatina (ver Tabela 14-5), que pode regenerar rapidamente o ATP a partir do ADP, pela reação da creatina quinase. Durante os períodos de contração ativa e glicólise, essa reação prossegue predominantemente na direção da síntese do ATP (Fig. 23-5); durante a recuperação do esforço, a mesma enzima é usada para ressintetizar a fosfocreatina a partir da creatina à custa do ATP.



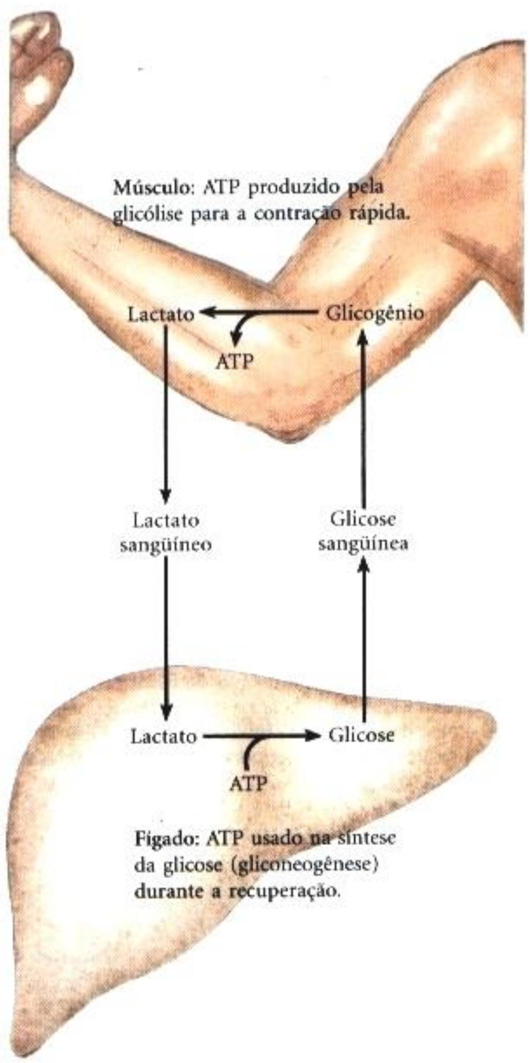

Músculo: ATP produzido pela glicólise para a contração rápida.
Lactato
Glicogênio
ATP
Lactato sangüíneo
Glicose sangüínea
Lactato
Glicose
ATP
Fígado: ATP usado na síntese da glicose (gliconeogênese) durante a recuperação.

Figura 23-6 – Cooperação metabólica entre o músculo esquelético e o fígado. Músculos extremamente ativos usam o glicogênio como fonte de energia, gerando lactato via glicólise. Durante a recuperação, parte desse lactato é transportada para o fígado e usada para formar glicose via gliconeogênese. A glicose é liberada no sangue e retorna aos músculos para repor as reservas de glicogênio. Esta via completa (glicose → lactato → glicose) constitui o ciclo de Cori.

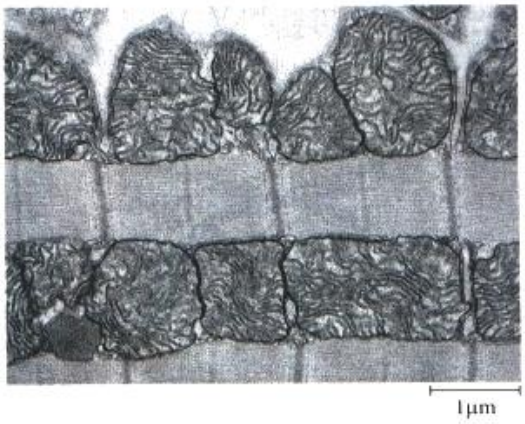


Figura 23-7 – Eletromicrografia do músculo cardíaco. Nas mitocôndrias abundantes, o piruvato, os ácidos graxos e os corpos cetônicos são oxidados para direcionar a síntese de ATP. Esse metabolismo aeróbio estacionário permite ao coração humano bombear sangue a uma velocidade de aproximadamente 6 litros por minuto, ou 350 litros por hora, ou 200 milhões de litros em 70 anos.

O músculo cardíaco difere do músculo esquelético no fato de este estar continuamente ativo, em um ritmo regular de contração e relaxamento. Ao contrário do músculo esquelético, o coração possui um metabolismo completamente aeróbico o tempo todo. As mitocôndrias são muito mais abundantes no músculo cardíaco que no músculo esquelético; elas perfazem quase metade do volume das células (Fig. 23-7). O coração usa como combustível uma mistura de glicose, ácidos graxos e corpos cetônicos que chegam do sangue; esses combustíveis são oxidados por meio do ciclo do ácido cítrico para liberar a energia necessária para produzir ATP pela fosforilação oxidativa. Da mesma forma que o músculo esquelético, o músculo cardíaco não armazena lipídios ou glicogênio em grandes quantidades. Pequenas quantidades de energia de reserva são armazenadas na forma de fosfocreatina, suficiente para poucos segundos de contração. Pelo fato de o coração ser normalmente aeróbio e obter sua energia a partir da fosforilação oxidativa, a impossibilidade de o O_2 alcançar uma parte do músculo cardíaco quando os vasos sangüíneos estão bloqueados por depósitos de lipídios (aterosclerose) ou coágulos sangüíneos (trombose coronariana) pode provocar a morte dessa região. Esse processo é conhecido como infarto do miocárdio, mais conhecido como ataque do coração.

O cérebro usa a energia para a transmissão dos impulsos elétricos

O metabolismo do cérebro é admirável em vários aspectos. Primeiro, o cérebro dos mamíferos adultos normalmente usa apenas glicose como combustível (Fig. 23-8). Segundo, o cérebro possui um metabolismo respiratório muito ativo (Fig. 23-9); ele usa O_2 a uma velocidade bem constante, responsável por quase 20% do O_2 total consumido em repouso. O cérebro contém muito pouco glicogênio, portanto ele é continuamente dependente da chegada da glicose do sangue. Se a glicose sangüínea cair significativamente abaixo de um certo nível crítico, mesmo que seja por um curto período, alterações graves e algumas vezes irreversíveis podem ocorrer na função cerebral.

Embora o cérebro não possa usar diretamente os ácidos graxos ou lipídios do sangue como combustível, ele pode, quando necessário, usar o β-hidroxibutirato (um corpo cetônico) formado a partir dos ácidos graxos nos hepatócitos. A capacidade do cérebro em oxidar o β-hidroxibutirato por meio do acetil-CoA torna-se importante durante o jejum prolongado, depois que todo o glicogênio hepático tenha sido esgotado, porque permite ao cérebro usar a gordura do organismo como energia. Isso poupa as proteínas musculares, que se tornam a fonte final da glicose para o cérebro (por meio da gliconeogênese) durante o jejum prolongado.

A glicose é oxidada pela glicólise e o ciclo do ácido cítrico, fornecendo quase todo o ATP usado pelo cérebro. A energia é necessária para criar e manter um potencial elétrico através da membrana plasmática dos neurônios. A membrana plasmática possui um sistema eletrogênico de contratransporte direcionado pelo ATP, a ATPase Na^+K^+, que bombeia simultaneamente 2 íons K^+ para dentro e 3 íons Na^+ para fora do neurônio (veja Fig. 12-33). O potencial transmembrana resultante muda transitoriamente à medida que um sinal elétrico (potencial de ação) passa da extremidade de um neurônio para outra (veja Fig. 13-5). Potenciais de ação são os principais mecanismos de transferência de informação no sistema nervoso.

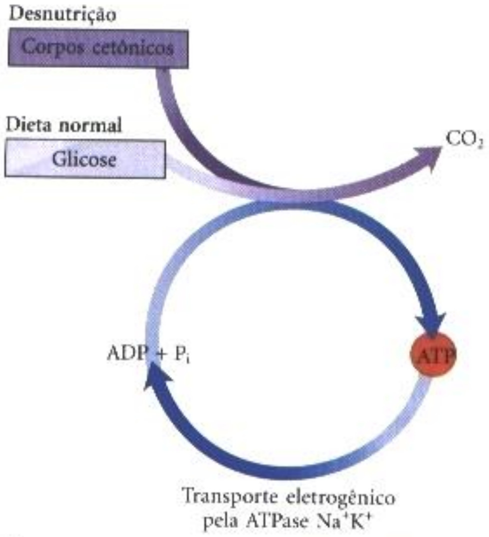


Figura 23-8 – As fontes de energia no cérebro variam com o estado nutricional. O corpo cetônico usado pelo cérebro é o β-hidroxibutirato.

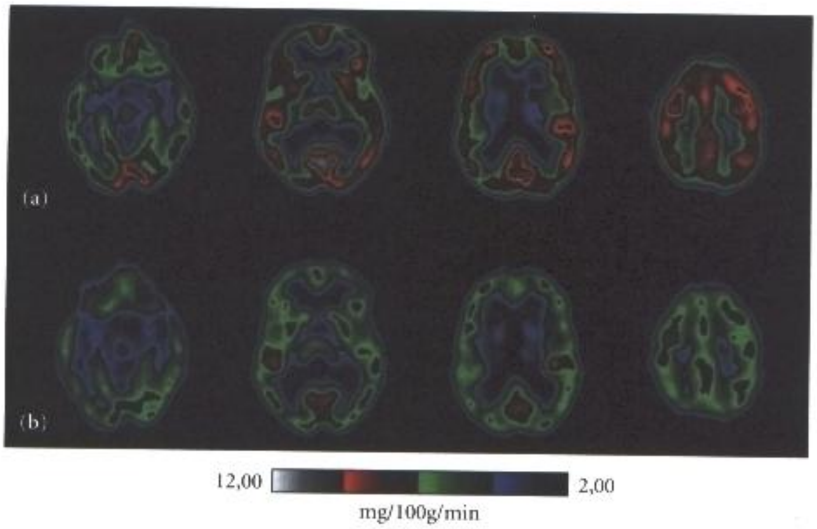


Figura 23-9 – Metabolismo da glicose no cérebro. A técnica de tomografia por varredura de emissão de pósitrons (PET) mostra a atividade metabólica em regiões específicas do cérebro. A PET permite a visualização da glicose marcada isotopicamente em regiões precisamente localizadas no cérebro de uma pessoa viva, em tempo real. A glicose enriquecida com C^{13} (não é um radioisótopo, e por isso não constitui um risco à saúde) é injetada na corrente sangüínea; poucos segundos mais tarde, a PET mostra quanto da glicose foi captada por cada região cerebral — uma medida da atividade metabólica. Estão mostrados aqui registros da PET de secções transversais do cérebro da frente para o dorso em quatro níveis de cima (à esquerda) para baixo (à direita). Os registros contrastam o metabolismo da glicose quando o indivíduo experimental está (**a**) em repouso e (**b**) em privação de sono por 48 horas.

O sangue transporta oxigênio, metabólitos e hormônios

O sangue medeia as interações metabólicas entre todos os tecidos. Ele transporta nutrientes do intestino delgado para o fígado e do fígado e tecido adiposo para outros órgãos; transporta também produtos residuais dos tecidos para a excreção renal. O oxigênio move-se no sangue dos pulmões para os tecidos e o CO_2 produzido pela respiração dos tecidos retorna ao sangue e aos pulmões para ser exalado. O sangue também transporta sinais hormonais de um tecido para outro. Na função de transportador de sinais, o sistema circulatório assemelha-se ao sistema nervoso; ambos regulam e integram as atividades dos diferentes órgãos.

O homem adulto médio possui de 5 a 6 litros de sangue. Quase metade desse volume é ocupada por três tipos de células sangüíneas (Fig. 23-10): **eritrócitos** (células vermelhas), preenchidas com hemoglobina e especializadas no transporte de O_2 e CO_2; um número muito menor de **leucócitos** (células brancas) de vários tipos, essenciais para o sistema imune que nos defende contra as infecções, e as **plaquetas**, que ajudam a mediar a coagulação sangüínea. A porção líquida é o **plasma sangüíneo**, que é 90% de água e 10% de solutos. Nele está dissolvida ou suspensa uma grande variedade de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabólitos, produtos residuais, íons inorgânicos e hormônios. Cerca de 70% dos sólidos plasmáticos são as **proteínas plasmáticas** (Fig. 23-10), primariamente as imunoglobulinas (anticorpos circulantes), soroalbumina, apolipoproteínas envolvidas no transporte de lipídios, transferrina (para o transporte do ferro) e as proteínas da coagulação como o fibrinogênio e a protrombina.

Os íons e os solutos de baixo peso molecular no plasma sangüíneo são componentes não fixos, mas estão em constante fluxo entre o sangue e os vários tecidos. A captação de íons inorgânicos da dieta é, em geral, contrabalançada pela excreção na urina. Para muitos dos componentes do sangue, algo semelhante a um equilíbrio estacionário é alcançado; a concentração dos componentes varia pouco, embora ocorra um fluxo contínuo entre o trato in-

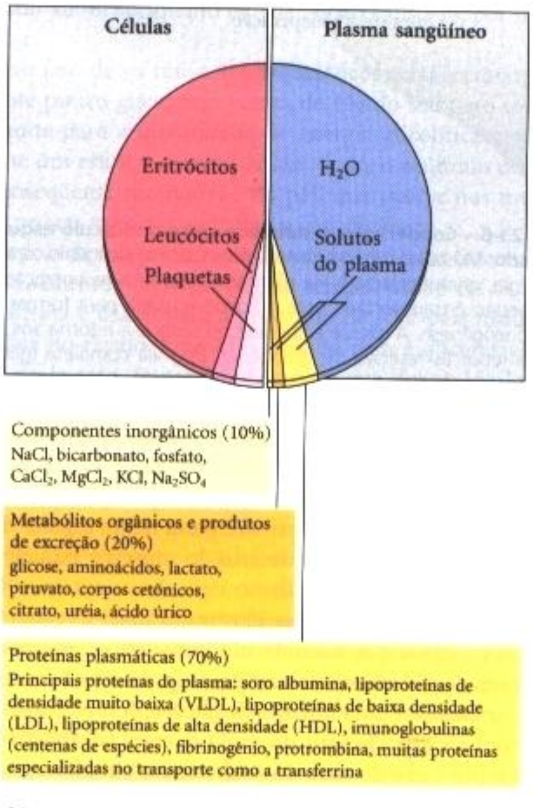


Figura 23-10 – A composição do sangue. O sangue é separado por centrifugação em plasma sangüíneo e células. Cerca de 10% do plasma sangüíneo é soluto, dos quais 10% consistem de sais inorgânicos, 20% de pequenas moléculas orgânicas e 70% de proteínas plasmáticas. Os principais componentes dissolvidos estão mostrados. O sangue contém muitas outras substâncias, freqüentemente em quantidades mínimas. Estas incluem outros metabólitos, enzimas, hormônios, vitaminas, microelementos e pigmentos biliares. A dosagem da concentração dos componentes no plasma sangüíneo é importante no diagnóstico e tratamento das doenças.

testinal, sangue e urina. Os níveis plasmáticos dos íons Na^+, K^+ e Ca^{2+} permanecem próximos de 140, 5 e 2,5mM, respectivamente, com pequena variação em resposta à ingestão alimentar. Qualquer afastamento significativo desses valores pode resultar em doença grave ou morte. Os rins desempenham um papel especialmente importante na manutenção do equilíbrio iônico, servindo como um filtro seletivo que permite que os produtos residuais e o excesso de íons passem do sangue para a urina, enquanto evita a perda dos nutrientes essenciais e dos íons.

A concentração da glicose dissolvida no plasma está também submetida a uma regulação estrita. Observamos as necessidades de glicose para o cérebro e o papel do fígado na manutenção da concentração da glicose em seu nível normal de 60 a 90mg/100mL de sangue (cerca de 4,5mM). Quando a glicose sangüínea do homem cai para 40mg/100mL (condição hipoglicêmica), a pessoa experimenta desconforto e confusão mental (Fig. 23-11); reduções maiores levam ao coma, às convulsões e, na hipoglicemia extrema, à morte. A manutenção da concentração normal da glicose no sangue é, portanto, uma alta prioridade do organismo, e uma variedade de mecanismos reguladores surgiu para alcançar esse fim. Entre os reguladores mais importantes da glicose sangüínea estão os hormônios insulina, glucagon e adrenalina.

Regulação Hormonal do Metabolismo Energético

Os ajustamentos "minuto a minuto", que mantêm o nível da glicose sangüínea próximo a 4,5mM, envolvem as ações combinadas da insulina, glucagon e adrenalina nos processos metabólicos de muitos tecidos do organismo, mas especialmente do fígado, músculo e tecido adiposo. A insulina sinaliza a esses tecidos que a concentração de glicose sangüínea é maior que a necessária; isso resulta na captação do excesso de glicose no sangue pelas células e sua conversão em compostos de armazenamento, glicogênio e triacilgliceróis. O glucagon carrega a mensagem que a glicose sangüínea está muito baixa e os tecidos respondem produzindo glicose por meio da degradação do glicogênio, da gliconeogênese e pela oxidação de gorduras para reduzir o uso de glicose. A adrenalina é liberada no sangue para preparar os músculos, os pulmões e o coração para um surto de atividade.

A adrenalina sinaliza a atividade iminente

Quando um animal é confrontado com uma situação estressante que requer uma atividade aumentada — lutar ou fugir, no caso extremo —, os sinais neurais do cérebro desencadeiam a liberação da **adrenalina** e **noradrenalina** da supra-renal. Ambos os hormônios aumentam a velocidade e a força dos batimentos cardíacos e elevam a pressão sangüínea, aumentando portanto o fluxo de O_2 e combustíveis para os tecidos e dilatando as passagens respiratórias, facilitando a captação do O_2 (Tabela 23-2).

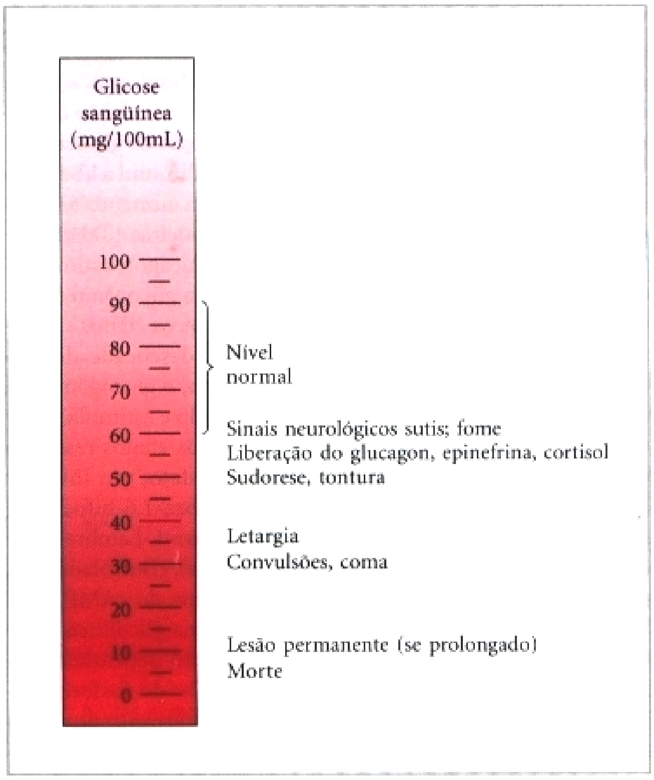

Glicose sangüínea (mg/100mL)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Nível normal
Sinais neurológicos sutis; fome
Liberação do glucagon, epinefrina, cortisol
Sudorese, tontura
Letargia
Convulsões, coma
Lesão permanente (se prolongado)
Morte

Figura 23-11 – Efeitos fisiológicos da queda da glicose sangüínea no homem. Níveis de glicose sangüínea abaixo de 40mg/100mL constituem hipoglicemia grave.

A adrenalina age primariamente no músculo, tecido adiposo e fígado. Ela ativa a glicogênio fosforilase e inativa a glicogênio sintase pela fosforilação dependente do cAMP das enzimas (veja Fig. 20-15), estimulando, portanto, a degradação do glicogênio hepático em glicose sangüínea, o combustível para o trabalho muscular anaeróbico. A adrenalina também promove a degradação anaeróbia do glicogênio do músculo esquelético em lactato pela fermentação, estimulando a formação glicolítica do ATP. A estimulação da glicólise é acompanhada pela elevação da concentração da frutose-2,6-bifosfato, um potente ativador alostérico da enzima glicolítica-chave, a fosfofrutoquinase-1 (veja Figs. 20-7 e 20-8). A adrenalina também estimula a mobilização de gorduras no tecido adiposo, ativando (pela fosforilação dependente do cAMP) a lipase dos triacilgliceróis (veja Fig. 17-3). Finalmente, a adrenalina estimula a secreção do glucagon e inibe a secreção da insulina, reforçando o seu efeito na mobilização dos combustíveis e inibindo o seu armazenamento.

Tabela 23-2 – Efeitos fisiológicos e metabólicos da adrenalina: preparo para a ação

Fisiológicos	
↑ Freqüência cardíaca ↑ Pressão sangüínea ↑ Dilatação das passagens respiratórias	Entrega aumentada de O_2 aos tecidos (músculos)
Metabólicos	
↑ Degradação do glicogênio (músculo, fígado) ↓ Síntese do glicogênio (músculo, fígado) ↑ Gliconeogênese (fígado)	Produção aumentada de glicose como combustível
↑ Glicólise (músculo)	Produção de ATP aumentada no músculo
↑ Mobilização de ácidos graxos (tecido adiposo)	Disponibilidade aumentada de ácidos graxos como combustível
↑ Secreção de glucagon ↓ Secreção de insulina	Reforça os efeitos metabólicos da adrenalina

O glucagon sinaliza a glicose sangüínea baixa

Mesmo na ausência de atividade física significante ou de estresse, várias horas após a ingestão de dieta de carboidratos, a glicose sangüínea cai abaixo de 4,5mM por causa da oxidação da glicose pelo cérebro e outros tecidos. A diminuição da glicose sangüínea desencadeia a secreção do glucagon e diminui a liberação da insulina (Fig. 23-12). O glucagon induz um aumento na concentração da glicose sangüínea de várias maneiras (Tabela 23-3). Da mesma forma que a adrenalina, o glucagon estimula a degradação do glicogênio hepático ativando a glicogênio fosforilase e inativando a glicogênio sintase; ambos os efeitos são resultado da fosforilação de enzimas reguladas, desencadeada pelo cAMP. Entretanto, ao contrário da adrenalina, o glucagon inibe a degradação da glicose pela glicólise no fígado e estimula a síntese da glicose pela gliconeogênese. Ambos os efeitos resultam da diminuição do nível da frutose-2,6-bifosfato, um inibidor alostérico da enzima gliconeogênica, a frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) e um ativador da fosfofrutoquinase-1. Lembre-se de que o nível da frutose-2,6-bifosfato é, no final, controlado pela reação da fosforilação de proteína, dependente do cAMP (veja Fig. 20-8). O glucagon também inibe a enzima glicolítica, a piruvato quinase (promovendo sua fosforilação dependente do cAMP), bloqueando, dessa forma, a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato e evitando a oxidação do piruvato por meio do ciclo do ácido cítrico; o acúmulo resultante do fosfoenolpiruvato favorece a gliconeogênese.

Estimulando a degradação do glicogênio hepático, evitando a utilização da glicose no fígado pela glicólise e promovendo a gliconeogênese, o glucagon capacita o fígado a exportar glicose ao sangue, restaurando a glicose em seu nível normal (Fig. 23-12).

Embora seu alvo primário seja o fígado, o glucagon (como a adrenalina) também afeta o tecido adiposo, ativando a lipase dos triacilgliceróis pela fosforilação dependente do cAMP. A lipase libera ácidos graxos livres, que são exportados para o fígado e outros tecidos como combustível, poupando, dessa forma, a glicose para o cérebro. O efeito geral do glucagon é, portanto, estimular a síntese e a liberação da glicose pelo fígado e induzir a mobilização dos ácidos graxos do tecido adiposo, para ser usados no lugar da glicose como combustível por outros tecidos que não o cérebro (Tabela 23-3). Todos esses efeitos do glucagon são mediados pela fosforilação de proteína dependente do cAMP.

Durante o jejum, curto ou prolongado, o metabolismo altera-se para fornecer combustível para o cérebro

As reservas energéticas de um homem adulto normal são de três tipos: glicogênio, armazenado no fígado e no músculo em quantidades relativamente pequenas; grandes quantidades de triacilgliceróis no tecido adiposo; e proteínas teciduais, que podem ser degradadas quando necessário para fornecer energia (Tabela 23-4).

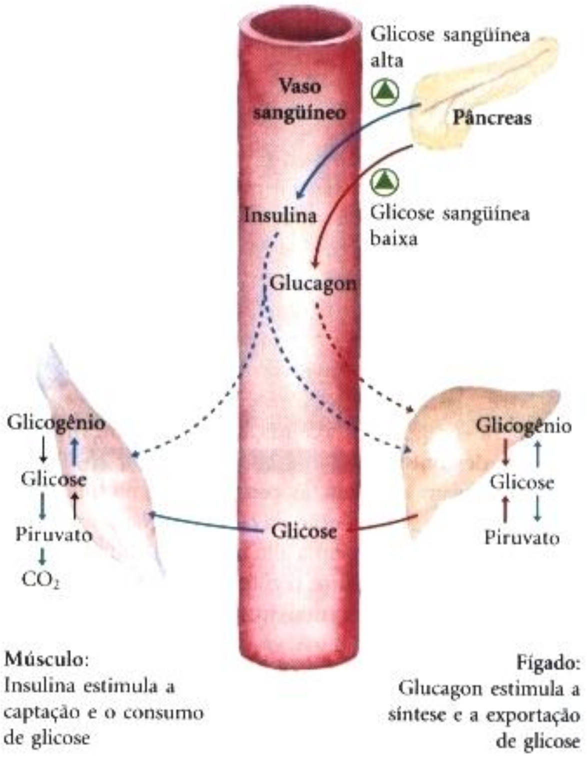


Figura 23-12 – Regulação da glicose sangüínea pela insulina e glucagon. As setas azuis indicam processos estimulados pela insulina; as setas vermelhas indicam processos estimulados pelo glucagon. Glicose sangüínea alta leva à secreção de insulina pelo pâncreas, e a glicose sangüínea baixa induz à liberação do glucagon, como descrito no texto.

A Figura 23-13 mostra as alterações no metabolismo energético durante o jejum prolongado. Depois de um jejum noturno, quase todo o glicogênio hepático e a maioria do glicogênio muscular foram depletados. Dentro de 24 horas, a concentração de glicose sangüínea começa a cair, a secreção de insulina diminui e a secreção de glucagon é estimulada. Esses sinais hormonais levam à mobilização dos triacilgliceróis, que se tornam os combustíveis primários para o músculo e o fígado. Para fornecer glicose para o cérebro, o fígado degrada certas proteínas (aquelas mais dispensáveis para um organismo que não está ingerindo alimento). Seus aminoácidos não-essenciais são desaminados (veja Capítulo 18) e seus grupos amino são convertidos em uréia no fígado. A uréia é exportada através da corrente sangüínea ao rim e é excretada. Também no fígado, os esqueletos carbônicos dos aminoácidos glicogênicos (veja Tabela 20-3) são convertidos em piruvato ou intermediários do ciclo do ácido cítrico. Esses intermediários, bem como o glicerol derivado dos triacilgliceróis no tecido adiposo, fornecem o material inicial para a gliconeogênese no fígado, produzindo glicose para o

Tabela 23-3 – Efeitos do glucagon na glicose sangüínea: produção e liberação da glicose pelo fígado

Efeito metabólico	Efeito no metabolismo da glicose	Enzima-alvo
↑ Degradação do glicogênio (fígado)	Glicogênio ⟶ glicose	↑ Fosforilase do glicogênio
↓ Síntese do glicogênio (fígado)	Menos glicose armazenada como glicogênio	↓ Glicogênio sintase
↓ Glicólise (fígado)	Menos glicose usada como combustível no fígado	↓ Fosfofrutoquinase-1
↑ Gliconeogênese (fígado)	Aminoácidos Glicerol } ⟶ glicose Oxaloacetato	↑ Frutose-1,6-bifosfatase ↓ Piruvato quinase
↑ Mobilização de ácido graxo (tecido adiposo)	Menos glicose usada como combustível pelo fígado, músculo	↑ Lipase dos triacilgliceróis

Tabela 23-4 – Disponibilidade de combustíveis metabólicos em um homem normal de 70kg e em um obeso no início de um jejum

Tipo de combustível	Peso (kg)	Equivalente calórico [milhares de kcal (kJ)]	Sobrevivência estimada (meses)*
Homem normal de 70kg:			
Triacilgliceróis (tecido adiposo)	15	141 (589)	
Proteínas (principalmente músculo)	6	24 (100)	
Glicogênio (músculo, fígado)	0,225	0,90 (3,8)	
Combustíveis circulantes (glicose, ácidos graxos, triacilglicerol etc.)	0,023	0,10 (0,42)	
Total		166 (694)	3
Homem obeso de 140kg:			
Triacilgliceróis (tecido adiposo)	80	752 (3.140)	
Proteínas (principalmente músculo)	8	32 (134)	
Glicogênio (músculo, fígado)	0,23	0,92 (3,8)	
Combustíveis circulantes	0,025	0,11 (0,46)	
Total		785 (3.280)	14

*O tempo de sobrevivência é calculado assumindo-se um gasto basal de energia de 1.800kcal/dia.

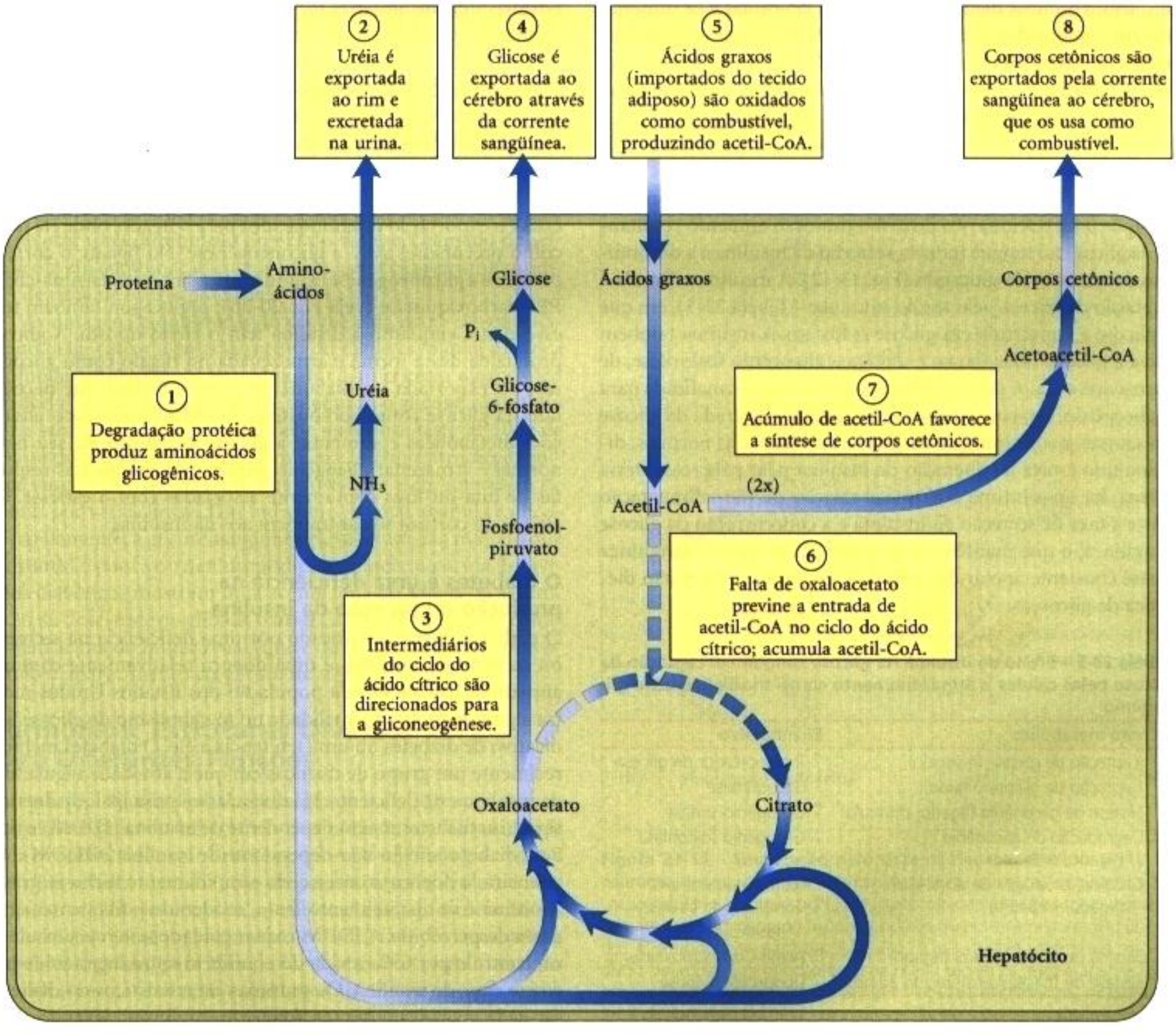

② Uréia é exportada ao rim e excretada na urina.
④ Glicose é exportada ao cérebro através da corrente sangüínea.
⑤ Ácidos graxos (importados do tecido adiposo) são oxidados como combustível, produzindo acetil-CoA.
⑧ Corpos cetônicos são exportados pela corrente sangüínea ao cérebro, que os usa como combustível.
Proteína
Amino-ácidos
Glicose
Ácidos graxos
Corpos cetônicos
P_i
Glicose-6-fosfato
Uréia
① Degradação protéica produz aminoácidos glicogênicos.
NH_3
⑦ Acúmulo de acetil-CoA favorece a síntese de corpos cetônicos.
Acetoacetil-CoA
(2x)
Acetil-CoA
Fosfoenol-piruvato
⑥ Falta de oxaloacetato previne a entrada de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico; acumula acetil-CoA.
③ Intermediários do ciclo do ácido cítrico são direcionados para a gliconeogênese.
Oxaloacetato
Citrato
Hepatócito

Figura 23-13 – Metabolismo energético no fígado durante jejum prolongado. Após a depleção das reservas de carboidratos, as proteínas tornam-se uma fonte importante da glicose, produzida a partir de aminoácidos glicogênicos pela gliconeogênese (etapas ① a ④). Os ácidos graxos importados dos tecidos adiposos são convertidos em corpos cetônicos para a exportação para o cérebro (etapas ⑤ a ⑧). As setas interrompidas representam reações por meio das quais há um fluxo reduzido durante o jejum prolongado.

cérebro. Eventualmente, o uso dos intermediários do ciclo do ácido cítrico na gliconeogênese depleta o oxaloacetato (etapa ③ na Fig. 23-13), evitando a entrada de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico. O acetil-CoA produzido pela oxidação do ácido graxo acumula-se (etapas ⑤ e ⑥), favorecendo a formação do acetoacetil-CoA (etapa ⑦) e corpos cetônicos no fígado. Depois de alguns dias de jejum, os níveis de corpos cetônicos no sangue elevam-se à medida que esses combustíveis são exportados do fígado para o coração, músculo esquelético e cérebro, que os usam no lugar da glicose (etapa ⑧).

Os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo de um adulto de peso normal fornece combustível para manter uma taxa basal do metabolismo por cerca de três meses; um adulto muito obeso armazena combustível para agüentar um jejum de mais de um ano (Tabela 23-4). Entretanto, esse jejum seria extremamente perigoso; ele quase certamente levaria a uma superprodução de corpos cetônicos (descritos a seguir) e, talvez, à morte. Quando as reservas de gordura se esgotam, inicia-se a degradação das proteínas essenciais; isso leva a perdas das funções cardíacas, hepáticas e, eventualmente, à morte. A gordura armazenada pode fornecer energia adequada (calorias) durante um jejum ou uma dieta restrita, mas as vitaminas e os minerais devem ser supridos, e são necessários aminoácidos glicogênicos suficientes para substituir aqueles usados para a gliconeogênese. As rações para dieta são por isso comumente suplementadas com vitaminas, minerais, aminoácidos ou proteínas.

A insulina sinaliza a glicose sangüínea alta

Quando a glicose entra na corrente sangüínea, vinda do intestino após uma refeição rica de carboidratos, o aumento resultante da glicose no sangue induz a secreção da insulina e a diminuição da secreção do glucagon (Fig. 23-12). A insulina estimula a captação da glicose pelo tecido muscular (Tabela 23-5), em que a glicose é convertida em glicose-6-fosfato. A insulina também ativa a glicogênio sintetase e inativa a glicogênio fosforilase, de forma que a maior parte da glicose-6-fosfato seja canalizada para o glicogênio. Em conseqüência da captação acelerada da glicose do sangue, a concentração da glicose cai aos níveis normais, diminuindo a taxa de liberação da insulina pelo pâncreas. Dessa forma, há uma íntima e ajustável relação de retroalimentação entre a taxa de secreção da insulina e a concentração da glicose sangüínea, o que mantém a concentração da glicose sangüínea quase constante apesar das grandes flutuações na ingestão dietética da glicose.

Tabela 23-5 – Efeito da insulina na glicose sangüínea: captação da glicose pelas células e armazenamento como triacilgliceróis e glicogênio

Efeito metabólico	Enzima-alvo
↑ Captação de glicose (músculo)	↑ Transportador de glicose
↑ Captação de glicose (fígado)	↑ Glicoquinase
↑ Síntese de glicogênio (fígado, músculo)	↑ Glicogênio sintase
↓ Degradação de glicogênio (fígado, músculo)	↓ Glicogênio fosforilase
↑ Glicólise, produção de acetil-CoA (fígado, músculo)	↑ Fosfofrutoquinase-1 ↑ Complexo da piruvato desidrogenase
↑ Síntese de ácidos graxos (fígado)	↑ Acetil-CoA carboxilase
↑ Síntese de triacilglicerol (tecido adiposo)	↑ Lipoproteína lipase

A insulina estimula o armazenamento do excesso de combustível como gordura. Ela ativa tanto a oxidação da glicose-6-fosfato até piruvato por meio da glicólise, quanto à oxidação do piruvato a acetil-CoA. O acetil-CoA não-oxidado na produção de energia é usado para a síntese de ácido graxo no fígado, e esses ácidos graxos são exportados como triacilgliceróis nas lipoproteínas plasmáticas (VLDLs) para o tecido adiposo. A insulina estimula a síntese do triacilglicerol nos adipócitos, usando os ácidos graxos liberados dos triacilgliceróis da VLDL. Esses ácidos graxos são, no final, derivados do excesso de glicose captado do sangue pelo fígado.

Em resumo, o efeito da insulina é favorecer a conversão do excesso de glicose sangüínea em duas formas de armazenamento: glicogênio (no fígado e músculo) e triacilgliceróis (no tecido adiposo) (Tabela 23-5).

Cortisol sinaliza o estresse, incluindo a glicose sangüínea baixa

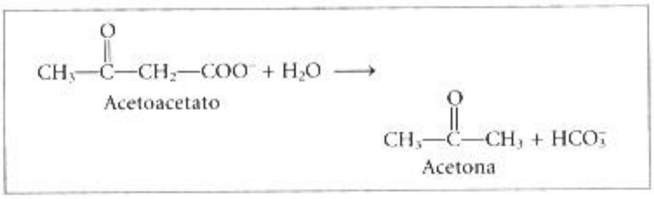
Uma variedade de estresses (ansiedade, medo, dor, hemorragia, infecções, glicose sangüínea baixa) estimula a liberação do hormônio corticosteróide **cortisol** pelo córtex da supra-renal. O cortisol age no músculo, fígado e tecido adiposo para suprir o organismo com combustíveis para uma iminente atividade intensa. O cortisol é um hormônio de ação relativamente lenta que altera o metabolismo mudando os tipos e as quantidades de certas enzimas que são sintetizadas nas suas células-alvo, mais do que regulando as moléculas de enzimas já existentes.

No tecido adiposo, o cortisol estimula a liberação de ácidos graxos a partir dos triacilgliceróis armazenados. Os ácidos graxos são exportados para o sangue para servir como combustíveis para vários tecidos e o glicerol resultante da degradação dos triacilgliceróis é usado para a neoglicogênese no fígado. O cortisol estimula a degradação de proteínas musculares não-essenciais e a exportação de aminoácidos para o fígado, onde ele serve como precursores para a gliconeogênese. No fígado, o cortisol promove a gliconeogênese estimulando a síntese da enzima-chave PEP carboxiquinase (veja Fig. 20-3b); o glucagon também tem esse efeito, enquanto a insulina tem o efeito oposto. A glicose produzida dessa forma é armazenada no fígado como glicogênio, ou exportada imediatamente para os tecidos que necessitam da glicose como combustível. O efeito final dessas alterações metabólicas é aumentar a glicose sangüínea até seu nível normal e armazenar glicogênio para suprir energia nas respostas de luta-ou-fuga comumente associadas com o estresse. Os efeitos do cortisol se contrapõem aos da insulina.

O diabetes é uma deficiência na produção ou na ação da insulina

O **diabetes melito**, provocado por uma deficiência na secreção ou na ação da insulina, é uma doença relativamente comum: aproximadamente 6% da população dos Estados Unidos mostra algum grau de anormalidade no metabolismo da glicose, indicativo de diabetes ou uma tendência a ele. O diabetes melito é realmente um grupo de doenças em que a atividade reguladora da insulina está deficiente. Há duas classes principais de doença: tipo 1 ou diabetes melito dependente de insulina (IDDM) e tipo 2 ou diabetes melito não-dependente de insulina (NIDDM). Na primeira, a doença começa cedo e rapidamente torna-se grave. A última é de aparecimento lento, moderado e freqüentemente passa despercebida. A IDDM requer cuidados e terapia insulínica, controle por toda a vida do equilíbrio entre ingestão de glicose e dose de insulina. Os sintomas característicos do diabetes são sede excessiva e micção freqüente (poliúria), levando à ingestão de grandes volumes de água (polidipsia). Essas alterações são causadas pela excreção de grandes quantidades de glicose na urina, uma condição conhecida como **glicosúria**. O termo diabetes melito significa "excreção excessiva de urina doce".

Uma outra alteração metabólica característica, resultante do defeito da ação da insulina no diabetes, é a excessiva, mas incompleta, oxidação dos ácidos graxos no fígado, resultando na superprodução dos corpos cetônicos acetoacetato e β-hidroxibutirato, que não podem ser usados pelos tecidos extra-hepáticos tão rápido quanto são sintetizados no fígado. Além do β-hidroxibutirato e do acetoacetato, o sangue dos diabéticos também contém acetona, que resulta da descarboxilação espontânea do acetoacetato:



$$\mathrm{CH_3{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}CH_2{-}COO^- + H_2O \longrightarrow CH_3{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}CH_3 + HCO_3^-}$$

Acetoacetato

Acetona

A acetona é volátil e exalada, dando ao hálito de um diabético não-tratado um odor característico, algumas vezes confundido com o etanol. Um diabético apresentando confusão mental por causa da alta taxa de glicose sangüínea pode ser ocasionalmente mal diagnosticado como vítima de intoxicação alcoólica, um erro que pode ser fatal. A superprodução de corpos cetônicos, chamada de **cetose**, resulta no seu aparecimento em concentrações intensamente aumentadas no sangue (cetonemia) e na urina (cetonúria; veja Tabela 17-2).

A oxidação dos triacilgliceróis para formar os corpos cetônicos produz ácidos carboxílicos, que se ionizam, liberando prótons. No diabetes não-controlado isso pode ultrapassar a capacidade de tamponamento do sistema de bicarbonato do sangue e provocar uma diminuição do pH do sangue, chamado de **acidose** ou, em combinação com a cetose, **cetoacidose**, uma condição de risco de morte potencial.

As dosagens bioquímicas do sangue e da urina são essenciais no diagnóstico e no tratamento do diabetes, o qual provoca profundas alterações no metabolismo. Um critério diagnóstico sensível é fornecido pelo **teste de tolerância à glicose**. Após uma noite sem alimento, o paciente bebe uma dose-teste de 100g de glicose dissolvida num copo com água. A concentração da glicose sangüínea é medida antes da dose-teste e em intervalos de 30min por várias horas. Um indivíduo normal assimila a glicose rapidamente, a glicose sangüínea eleva-se até não mais do que 9 a 10mM e pouca ou nenhuma glicose aparece na urina. Indivíduos diabéticos mostram uma acentuada deficiência na assimilação da dose-teste da glicose, o nível da glicose sangüínea eleva-se bem acima do limiar renal (que é de cerca de 10mM), provocando o aparecimento da glicose na urina.

Hormônios: Estruturas Diversas para Diferentes Funções

A regulação do metabolismo energético constitui apenas uma das muitas funções integrativas dos hormônios. Virtualmente cada processo nos organismos superiores é regulado por um ou mais hormônios: manutenção da pressão arterial, volume sangüíneo e equilíbrio eletrolítico; embriogênese; diferenciação sexual, desenvolvimento e reprodução; fome, comportamento alimentar e digestão, para mencionar alguns. Nós vamos analisar métodos para a detecção e mensuração dos hormônios e sua interação com receptores e vamos considerar uma seleção representativa de tipos de hormônios.

A coordenação do metabolismo nos órgãos separados dos mamíferos é alcançada pelo sistema neuroendócrino. Células individuais em um tecido sentem uma alteração nas condições do organismo e respondem secretando um mensageiro químico extracelular, que passa para outra célula, onde se liga a uma molécula receptora e desencadeia uma mudança na segunda célula.

Na sinalização neuronal (Fig. 23-14a), o mensageiro químico (neurotransmissor; acetilcolina, por exemplo) pode percorrer apenas uma fração de um micrômetro, através da fenda sináptica ao neurônio seguinte de uma cadeia. Os hormônios, ao contrário, são transportados pelo sangue entre órgãos e tecidos distantes; eles podem viajar um metro ou mais antes de encontrar a sua célula-alvo (Fig. 23-14b). Exceto por essa diferença anatômica, esses dois mecanismos de sinalização química são admiravelmente

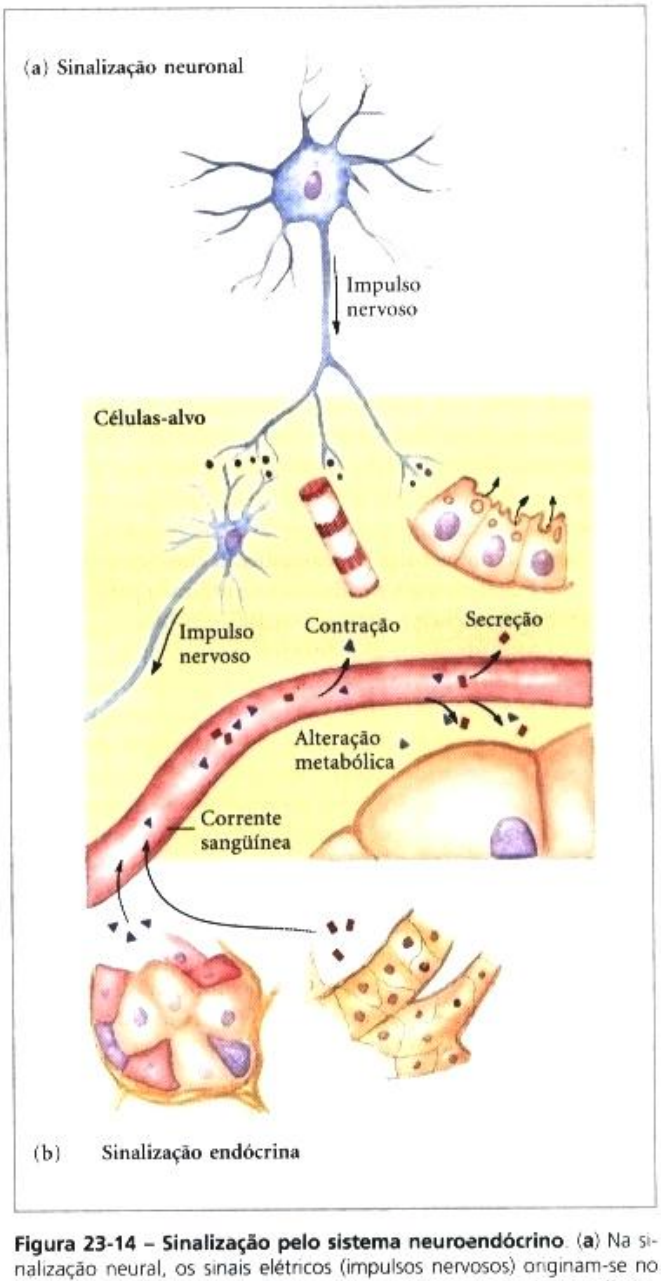


Figura 23-14 – Sinalização pelo sistema neuroendócrino. (**a**) Na sinalização neural, os sinais elétricos (impulsos nervosos) originam-se no corpo celular e são transportados muito rapidamente por longas distâncias até a extremidade do axônio, onde os neurotransmissores são liberados e difundem-se para a célula-alvo. A célula-alvo, que pode ser um outro neurônio, um miócito ou uma célula secretora, está a apenas uma fração de um micrômetro ou a alguns poucos micrômetros distante do local de liberação do neurotransmissor. (**b**) No sistema endócrino, os hormônios são liberados na corrente sangüínea, que os transportam através do corpo até os tecidos-alvo, que poderão estar mais de um metro distante da célula secretora. Tanto os neurotransmissores quanto os hormônios interagem com receptores específicos na célula-alvo, desencadeando respostas.

semelhantes. A adrenalina e a noradrenalina, por exemplo, funcionam como neurotransmissores em certas sinapses do cérebro e músculo liso e também como hormônios, regulando o metabolismo energético no fígado e no músculo. Na discussão sobre a sinalização celular que se segue, enfatizaremos a ação hormonal ilustrando nossas discussões anteriores sobre o metabolismo energético, mas a maioria dos mecanismos fundamentais descritos aqui também ocorre na ação do neurotransmissor.

A descoberta e a purificação de um hormônio requerem um ensaio biológico

Como um hormônio é descoberto e purificado? Primeiramente, descobre-se que um processo fisiológico em um tecido é dependente de um sinal que se origina em um outro tecido. A insulina, por exemplo, foi pela primeira vez reconhecida como uma substância produzida pelo pâncreas capaz de afetar o volume e a composição da urina produzida por um cão (Adendo 23-1). Quando é descoberto um efeito fisiológico de um hormônio, um ensaio biológico para quantificá-lo pode ser desenvolvido. No caso da insulina, o ensaio consistia na injeção de extratos de pâncreas (a origem bruta da insulina) em animais experimentais deficientes em insulina (Adendo 23-1) e a quantificação das resultantes variações das concentrações de glicose no sangue e na urina. A leptina, o hormônio que inibe o comportamento alimentar quando os depósitos de triacilglicerol no organismo são adequados, foi descoberta como um fator levado pelo sangue de um camundongo normal, capaz de reverter o comportamento de ingestão alimentar excessiva de um camundongo mutante (no qual faltava a leptina). Para isolar um hormônio, extratos que contêm esse hormônio são fracionados pelas mesmas técnicas usadas para purificar outras biomoléculas (fracionamento com solventes, cromatografia e eletroforese), e cada fração é utilizada para o ensaio de atividade hormonal. Quando o material é purificado, sua composição e estrutura química podem ser determinadas.

Essa fórmula para a caracterização de um hormônio é enganosamente simples. Os hormônios são tão potentes que necessitam ser produzidos somente em quantidades muito pequenas. A obtenção de quantidades suficientes de um hormônio para permitir sua caracterização química envolve freqüentemente isolamentos bioquímicos em uma escala heróica. Quando Roger Guillemin e Andrew Schally independentemente purificaram e caracterizaram o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) do hipotálamo, o grupo de Schally processou cerca de 20 toneladas de hipotálamos provenientes de aproximadamente dois milhões de ovelhas, enquanto o grupo de Guillemin extraiu hipotálamos de cerca de um milhão de porcos! O TRH mostrou ser um derivado do tripeptídeo Glu–His–Pro (Fig. 23-15). Quando a estrutura do hormônio foi conhecida, ele pôde ser quimicamente sintetizado em grandes quantidades para uso em estudos bioquímicos e fisiológicos.

Pelos seus trabalhos em hormônios hipotalâmicos, Schally e Guillemin compartilharam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1977 com Rosalyn Yalow, a qual (com Solomon A. Berson) desenvolveu o **radioimunoensaio (RIA)** extraordinariamente sensível para a medida dos hormônios peptídicos e usado para estudar a ação dos hormônios. O RIA revolucionou a pesquisa de hormônios ao tornar possível a determinação rápida, quantitativa e específica de muitos deles em quantidades diminutas.

Anticorpos específicos de hormônios constituem a chave do radioimunoensaio. Hormônios purificados, injetados em coelhos, induzem à formação de anticorpos que se ligam aos hormônios com alta afinidade e especificidade. Quando uma quantidade constante de anticorpo é incubada com uma quantidade fixa de hormônio marcado radioativamente, uma certa fração do hormônio radioativo se liga ao anticorpo (Fig. 23-16). Se, além do hormônio radioativo, o hormônio não marcado também estiver presente, este último irá competir e deslocar o hormônio marcado do seu local de ligação no anticorpo. Essa competição de ligação pode ser quantificada, tendo como referência uma curva-padrão feita com quantidades conhecidas do hormônio não marcado. O grau de deslocamento do hormônio marcado do anticorpo é uma medida da quantidade do hormônio não marcado presente nas amostras de sangue ou dos extratos dos tecidos. Usando hormônios com alta radioatividade, é possível fazer ensaios com sensibilidade para detectar picogramas de um hormônio. A mais nova variação dessa técnica, chamada de ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA), está ilustrada na Figura 7-28b.

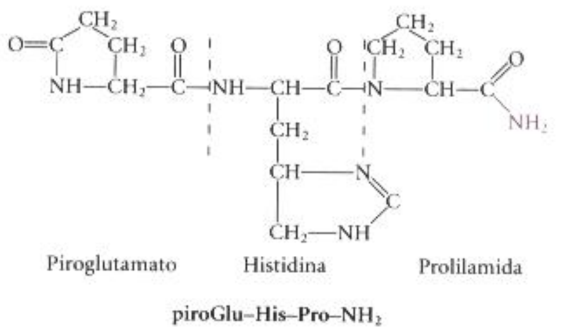


Figura 23-15 – A estrutura do hormônio liberador da tireotrofina (TRH). Purificado de extratos de hipotálamo por esforços heróicos, o TRH demonstrou ser um derivado do tripeptídeo Glu–His–Pro. O grupo carboxila da cadeia lateral do Glu aminoterminal forma uma amida (vermelho) com o α-amino do grupo Glu, formando o piroglutamato, e o grupo carboxila da prolina carboxiterminal é convertido em uma amida (vermelho). Tais modificações são comuns entre os pequenos hormônios peptídicos. Em uma proteína típica de 50kDa, as cargas nos resíduos amino e carboxiterminais contribuem relativamente pouco para a carga total da proteína, mas, em um hormônio tripeptídeo, essas duas cargas poderiam dominar as propriedades do peptídeo. A formação de derivados amida mascara essas cargas.

Roger Guillemin

Andrew V. Schally

Rosalyn S. Yalow

Adendo 23-1

Como um hormônio é descoberto? O árduo caminho na purificação da insulina

Milhões de pessoas com diabetes melito tipo 1 (dependente de insulina) auto-injetam-se diariamente insulina pura para compensar o fato de esse hormônio crítico não ser produzido por suas próprias células β-pancreáticas. A injeção de insulina não constitui a cura do diabetes, mas permite que pessoas que, de outra forma, poderiam ter morrido mais jovens vivam mais tempo e tenham uma vida produtiva. A descoberta da insulina ilustra a combinação de observações casuais e experimentação cuidadosa, pelas quais muitos hormônios têm sido descobertos.

Em 1889, Oskar Minkowski, um jovem assistente da Escola Médica de Strasburgo, e Josef von Mering, do Instituto Hoppe-Seyler em Strasburgo, discordaram amigavelmente sobre a questão de o pâncreas, conhecido por conter lipases, ser importante para a digestão das gorduras no cão. Para resolver esse assunto, eles removeram cirurgicamente o pâncreas de um cão. Contudo, antes que os experimentos sobre a digestão das gorduras fossem realizados, Minkowski observou que o cão produzia muito mais urina que o normal (um sintoma comum do diabetes não-tratado). A urina do cão também apresentava glicose (outro sintoma do diabetes). Isso implicava que a falta de algum produto pancreático causava o diabetes. Minkowski tentou, sem sucesso, preparar um extrato de pâncreas de cão que pudesse reverter os efeitos da remoção do pâncreas (que pudesse diminuir os níveis de glicose do sangue e da urina). Sabemos agora que a insulina é uma proteína e que o pâncreas é muito rico em proteases (tripsina e quimotripsina), que normalmente são liberadas diretamente no intestino delgado para auxiliar na digestão. Essas proteases, sem dúvida, degradavam a insulina nos extratos pancreáticos de Minkowski. Apesar de considerável esforço, nenhum progresso significativo foi feito no isolamento e caracterização do "fator antidiabético" até o verão de 1921, quando Frederick G. Banting, um jovem cientista trabalhando no laboratório de J.J.R. MacLeod na Universidade de Toronto, e um estudante assistente, Charles Best, dedicaram-se ao problema. Obtiveram várias linhas de evidências que apontavam um grupo de células especializadas no pâncreas (as ilhotas de Langerhans, veja Fig. 23-25) como a fonte do "fator antidiabético", que por isso foi chamado de insulina (do latim *insula*, "ilha").

Tomando precauções para evitar a proteólise, Banting e Best (mais tarde auxiliados por J.B. Collip) foram bem-sucedidos no preparo de um extrato pancreático purificado, em dezembro de 1921, que curou os sintomas do diabetes experimental em cães. Em janeiro de 1922 (um mês mais tarde!), essa preparação de insulina foi administrada em Leonard Thompson, um menino de 14 anos gravemente enfermo com diabetes melito. Em alguns dias, os níveis de corpos cetônicos e de glicose na urina de Thompson caíram drasticamente; o extrato salvou sua vida. Em 1923, Banting e MacLeod ganharam o Prêmio Nobel pelo isolamento da insulina. Banting imediatamente anunciou que ele dividiria seu prêmio com Best; e MacLeod dividiu o seu com Collip.

A partir de 1923, as companhias farmacêuticas supriram milhares de pacientes por todo o mundo com insulina extraída do pâncreas de porco. Com o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética na década de 1980 (veja Capítulo 29), foi possível produzir quantidades ilimitadas de insulina humana, colocando o gene clonado da insulina humana em um microrganismo, o qual foi cultivado em escala industrial. Atualmente em alguns pacientes são implantadas bombas de insulina, que liberam quantidades ajustáveis de insulina para atender às necessidades em períodos de refeição e durante o exercício. Há uma razoável esperança de que, no futuro, o transplante de tecido pancreático fornecerá aos pacientes diabéticos a fonte de insulina que responderá como um pâncreas normal faz, liberando insulina na corrente sangüínea somente quando a glicose no sangue aumenta.

Frederick G. Banting
(1891-1941)

J.J.R. MacLeod
(1876-1935)

Charles Best
(1899-1978)

J.B. Collip
(1892-1965)

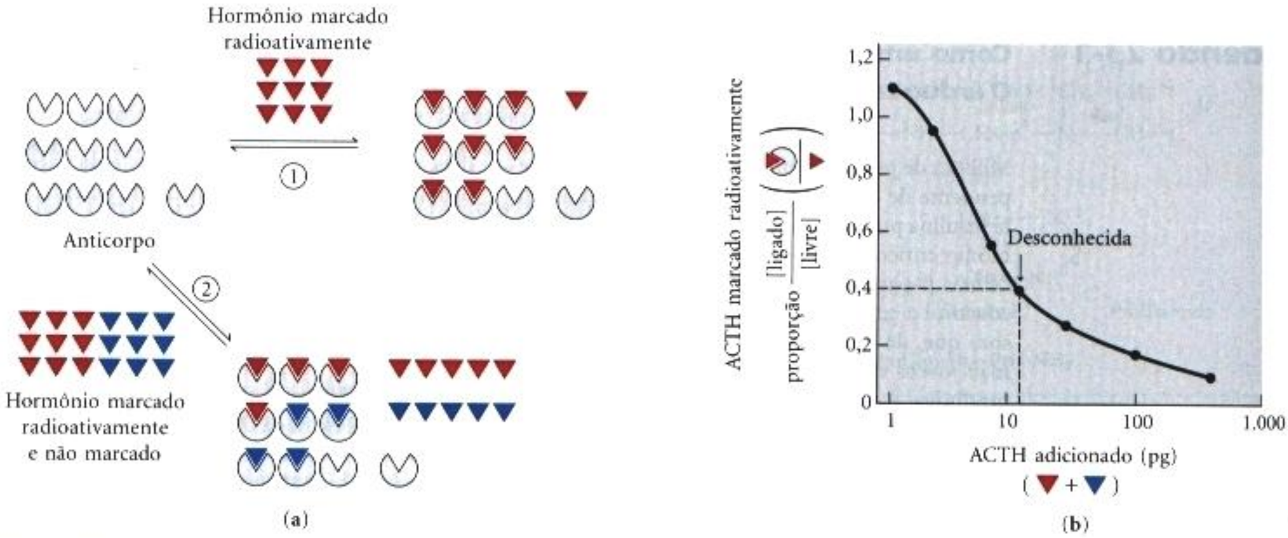


Figura 23-16 – O princípio do radioimunoensaio (RIA) e um exemplo real. (**a**) Uma baixa concentração do hormônio marcado radioativamente (vermelho) é incubada com uma quantidade fixa de anticorpo específico desse hormônio ①, ou na presença de várias concentrações do hormônio não marcado (azul; ②). As moléculas do hormônio não marcado competem com as radioativamente marcadas pela ligação com o anticorpo. A quantidade do hormônio radioativamente marcado ligado reflete assim a concentração do hormônio não marcado presente. (**b**) Um radioimunoensaio para o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Uma curva-padrão do [ACTH marcado radioativamente ligado] vs. [ACTH não marcado adicionado] é construída e usada para determinar a concentração do ACTH (não marcado) em uma amostra desconhecida. Se uma alíquota contendo uma quantidade desconhecida do hormônio não marcado der um valor de 0,4 para a proporção [ligado]/[livre] (veja seta), a alíquota deverá conter cerca de 20pg de ACTH.

Hormônios agem por meio de receptores celulares específicos de alta afinidade

Vimos no Capítulo 13 que todos o hormônios agem por meio de receptores específicos localizados nas células-alvo sensíveis ao hormônio, aos quais os hormônios se ligam com alta especificidade e alta afinidade (veja Fig. 13-2). Cada tipo celular tem sua própria combinação de receptores hormonais, a qual define a sua responsividade aos hormônios. Além disso, dois tipos de células com o mesmo receptor podem ter alvos intracelulares diferentes para a ação do hormônio e assim responder diferentemente diante do mesmo hormônio. A especificidade de ação do hormônio resulta da complementaridade entre o hormônio e seu receptor. Essa interação é extremamente seletiva, permitindo que hormônios com estruturas semelhantes tenham efeitos diferentes, e a alta afinidade da interação permite que as células respondam a concentrações muito baixas dos hormônios. No delineamento de drogas propostas para interferir na regulação hormonal, torna-se essencial conhecer a especificidade e a afinidade relativa da droga e o hormônio natural. Lembre-se de que a interação hormônio-receptor pode ser quantificada pela análise de Scatchard (veja Adendo 13-1), a qual, em condições favoráveis, fornece uma medida quantitativa da afinidade (a constante de dissociação do complexo) e também o número de locais de ligação do hormônio em uma preparação.

O local de encontro entre o hormônio e o receptor pode ser extracelular, citosólico, ou nuclear, dependendo do tipo de hormônio. As conseqüências intracelulares da interação hormônio-receptor são de quatro tipos gerais (veja Fig. 13-2): (1) uma alteração no potencial de membrana resulta da abertura ou fechamento de um canal iônico ligado ao hormônio; (2) um receptor, que é uma enzima, é ativado pelo hormônio extracelular; (3) um segundo mensageiro, como o cAMP ou o inositol trifosfato, é gerado dentro da célula e atua como um regulador alostérico de alguma(s) enzima(s)-chave; ou (4) há uma alteração no nível de expressão de algum(ns) gene(s) mediada pelo receptor protéico nuclear ligado ao hormônio.

Hormônios peptídicos e aminas solúveis em água (insulina e adrenalina, por exemplo) agem em suas células-alvo pela ligação a receptores localizados na superfície celular espalhados na membrana plasmática (Fig. 23-17). Após a ligação do hormônio ao seu domínio extracelular, o receptor sofre uma mudança conformacional análoga àquela produzida pela ligação de uma molécula efetora a uma enzima alostérica. A mudança conformacional desencadeia os efeitos em cascata dos hormônios.

Uma simples molécula de hormônio, formando um complexo com seu receptor, ativa uma catálise que produz muitas moléculas do segundo mensageiro; assim, o receptor serve não somente como um transdutor, mas também como um amplificador do sinal. Muitos hormônios agem por meio de uma cascata de sinalização, uma série de etapas que, em cada uma delas, um catalisador ativa outro, resultando em uma grande amplificação do sinal original. Um exemplo ocorre na regulação da síntese e degradação do glicogênio pela adrenalina (veja Fig. 13-15). A adrenalina ativa (através do seu receptor) a adenilciclase, que produz muitas moléculas de cAMP por cada molécula de hormônio ligada ao receptor. O cAMP, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de cAMP, a qual ativa a fosforilase quinase, que ativa a glicogênio fosforilase. O resultado é uma amplificação do sinal: uma molécula de adrenalina produz milhares de moléculas de glicose-1-fosfato a partir do glicogênio.

Hormônios insolúveis em água (esteróides, retinóides e hormônios tireóideos) passam através da membrana plasmática das suas células-alvo para alcançar suas proteínas receptoras no núcleo (Fig. 23-17). Nessa classe de hormônios, o próprio complexo hormônio-receptor leva a mensagem; ele interage com o DNA, alterando a expressão de genes específicos, modificando o complemento enzimático da célula e, por conseguinte, o seu metabolismo (veja Fig. 13-29).

Os hormônios que agem através de receptores localizados na membrana plasmática geralmente desencadeiam respostas bioquímicas ou fisiológicas muito rápidas. Segundos após a adrenalina ter sido secretada na corrente circulatória pela supra-renal, o músculo esquelético responde acelerando a degradação do glicogênio.

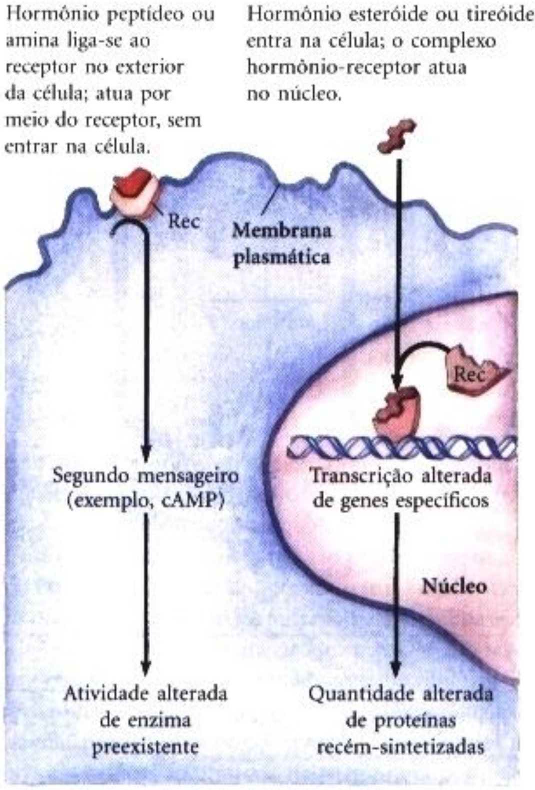

Hormônio peptídeo ou amina liga-se ao receptor no exterior da célula; atua por meio do receptor, sem entrar na célula.
Hormônio esteróide ou tireóideo entra na célula; o complexo hormônio-receptor atua no núcleo.
Rec
Membrana plasmática
Rec
Segundo mensageiro (exemplo, cAMP)
Transcrição alterada de genes específicos
Núcleo
Atividade alterada de enzima preexistente
Quantidade alterada de proteínas recém-sintetizadas

Figura 23-17 – Dois mecanismos gerais da ação hormonal. Os hormônios peptídeos e as aminas são de ação mais rápida que os hormônios esteróides e tireóideos.

Em contraste, os hormônios tireóideos e os sexuais (esteróides) promovem respostas máximas em seus tecidos-alvo somente após horas ou até mesmo dias. Essas diferenças temporais de resposta correspondem aos diferentes modos de ação. Em geral, os hormônios de ação rápida promovem mudanças na atividade de uma ou mais enzimas preexistentes na célula, por mecanismos alostéricos ou por modificações covalentes da(s) enzima(s). Os hormônios de ação lenta geralmente alteram a expressão gênica, resultando na síntese de mais ou de menos proteína(s) reguladora(s).

Os hormônios são moléculas quimicamente diversas

Há diferentes classes de hormônios em mamíferos, distintas por sua estrutura química e modos de ação (Tabela 23-6). Os hormônios peptídicos, aminas e eicosanóides agem nas células-alvo via receptores de superfície. Os hormônios esteróides, tireóideos, retinóides e a vitamina D entram na célula e atuam por meio de receptores nucleares. O óxido nítrico também entra na célula, mas ativa uma enzima citosólica, a guanilato ciclase (veja Fig. 13-9).

Os hormônios podem também ser classificados quanto à distância que percorrem para atingir seu tecido-alvo a partir do local de sua liberação. Hormônios **endócrinos** (do grego *endon*, que significa "dentro", e *krinein*, "liberar") são liberados no sangue e levados até as células-alvo por todo o corpo. Hormônios **parácrinos** são liberados no espaço extracelular por uma célula e se difundem até as células-alvo vizinhas. Hormônios **autócrinos** são liberados por uma célula e afetam a mesma célula pela ligação a receptores na sua própria superfície.

Os mamíferos não são os únicos que possuem sistemas de sinalização hormonal. Os insetos e os vermes nematóides possuem sistemas de regulação hormonal altamente desenvolvidos, cujos mecanismos fundamentais são semelhantes aos dos mamíferos. As plantas, também, usam sinais hormonais para coordenar as atividades de seus vários tecidos. O estudo das ações hormonais não é tão desenvolvido em plantas como em mamíferos, mas está claro que alguns mecanismos são comuns. Para ilustrar a diversidade estrutural e a variedade de ações dos hormônios de mamíferos, vamos considerar na Tabela 23-6 exemplos representativos de cada uma das principais classes de hormônios.

Hormônios peptídeos. Os **hormônios peptídeos** podem ter de 3 a 200 resíduos de aminoácidos. Eles incluem os hormônios pancreáticos insulina, glucagon e somatostatina e todos os hormônios do hipotálamo e da hipófise (descritos a seguir). Esses hormônios são sintetizados nos ribossomos como proteínas precursoras mais longas (pró-hormônio), as quais são empacotadas em vesículas de secreção e clivadas por proteólise para formar os peptídeos ativos. **Insulina** é uma pequena proteína (M_r 5.700) com duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas por duas pontes dissulfeto. Ela é sintetizada no pâncreas como um precursor inativo de uma única cadeia , pré-proinsulina (Fig. 23-18), com uma "seqüência de sinal" aminoterminal, que dirige sua passagem para as vesículas secretoras. (Seqüências de sinal são discutidas no Capítulo 27; veja Fig. 27-35). A remoção proteolítica da seqüência de sinal e a formação das três pontes dissulfeto produzem a proinsulina, que é estocada nos grânulos de secreção nas células pancreáticas. Quando a elevação da glicose sangüínea desencadeia a secreção da insulina, a proinsulina é convertida em insulina ativa por proteases específicas, que clivam duas ligações peptídicas para formar a molécula de insulina madura.

Em alguns casos, os pró-hormônios fornecem um simples hormônio peptídeo, mas freqüentemente vários hormônios ativos se originam do mesmo pró-hormônio. O pró-opiomelanocortina (POMC) é um exemplo espetacular de múltiplos hormônios codificados por um simples gene. O gene POMC codifica um polipeptídeo longo que é progressivamente clivado em um total de, pelo menos, nove peptídeos biologicamente ativos (Fig. 23-19). Os resíduos terminais dos hormônios peptídeos são freqüentemente modificados, assim como ocorre com o TRH (Fig. 23-15).

Tabela 23-6 – Classes dos hormônios

Tipo	Exemplo	Origem	Via sintética	Modo de ação
Peptídeo	Leu-encefalina	Tyr–Gly–Gly–Phe–Leu	Processamento proteolítico da proenzima	Receptores na membrana plasmática, segundos mensageiros
Catecolamina	Adrenalina	Tirosina		
Eicosanóide	PGE_1	Ácido graxo 20:4		
Esteróide	Testosterona	Colesterol		
Retinóide	Ácido retinóico	Vitamina A		Receptores nucleares; regulação transcricional
Tireóide	Triiodotironina (T_3)	Tyr na tireoglobulina		
Vitamina D	1,25-diidroxicolecalciferol	Colesterol ou vitamina D		
Óxido nítrico	Óxido nítrico	$NO^•$	Arginina + O_2	Receptores citosólicos (guanilato ciclase) e segundo mensageiro (cGMP)

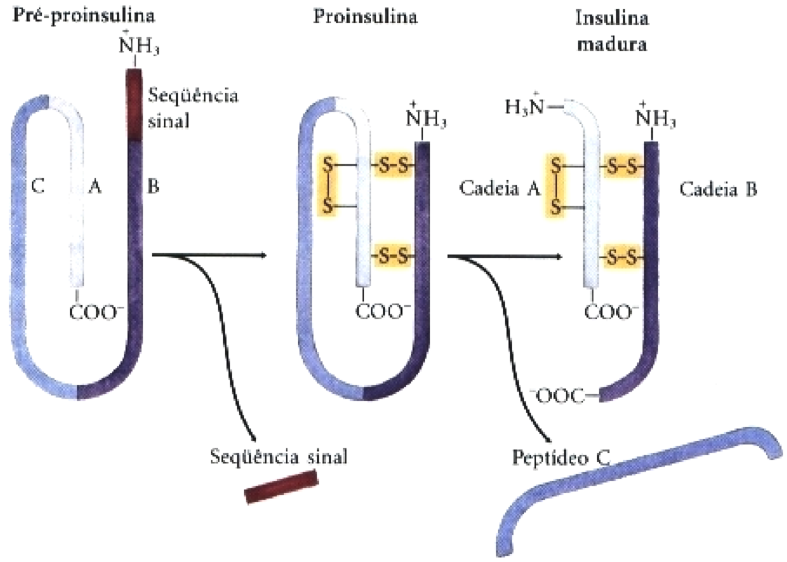

Pré-proinsulina
$\overset{+}{N}H_3$
Seqüência sinal
C
A
B
COO⁻
Proinsulina
$\overset{+}{N}H_3$
S
S
-S-S-
-S-S-
COO⁻
Seqüência sinal
Insulina madura
$H_3\overset{+}{N}$
$\overset{+}{N}H_3$
Cadeia A
Cadeia B
S
S
-S-S-
-S-S-
COO⁻
⁻OOC
Peptídeo C

Figura 23-18 – Insulina. A insulina madura é formada a partir de seu precursor maior, a pré-proinsulina, por processamento proteolítico. A remoção dos 23 aminoácidos (seqüência sinalizadora) no aminoterminal da pré-proinsulina e a formação de três pontes dissulfeto produzem a proinsulina. Cortes proteolíticos posteriores removem o peptídeo C, deixando a insulina madura, composta das cadeias A e B. A seqüência de aminoácidos da insulina bovina está mostrada na Figura 5-24.

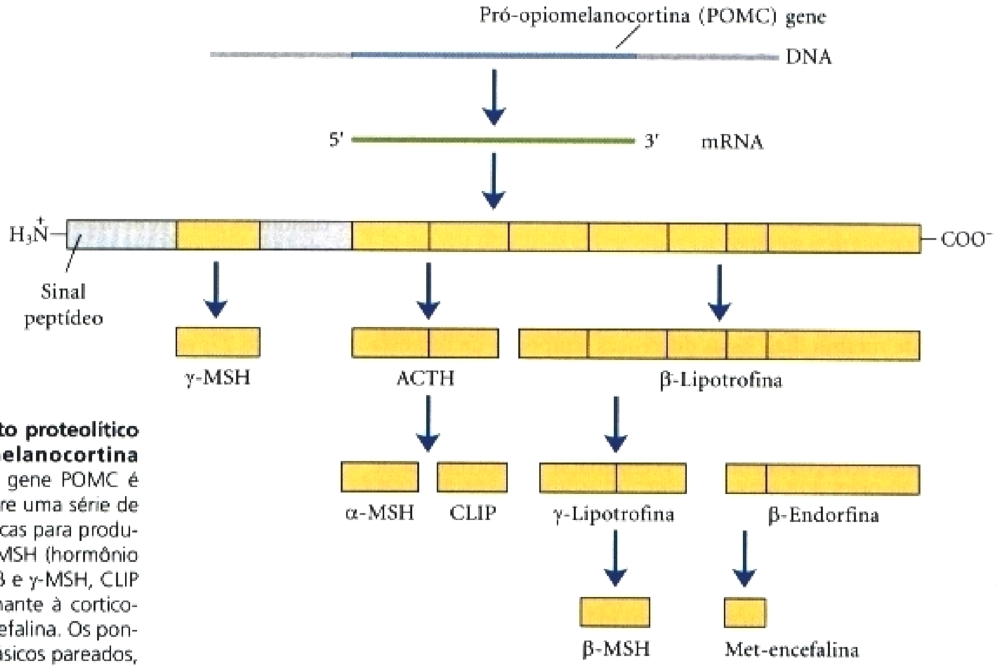
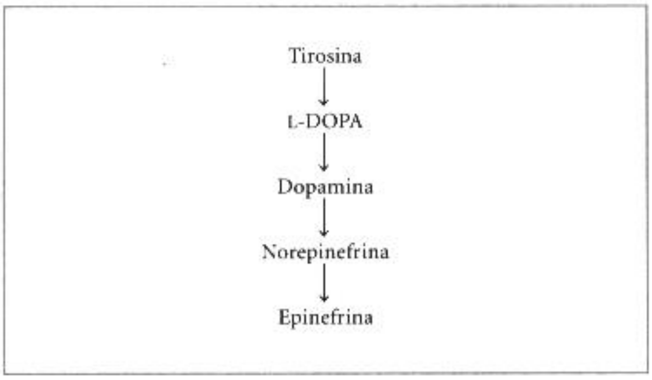

Pró-opiomelanocortina (POMC) gene
DNA
5'
3'
mRNA
$H_3\overset{+}{N}$
COO⁻
Sinal peptídeo
γ-MSH
ACTH
β-Lipotrofina
α-MSH
CLIP
γ-Lipotrofina
β-Endorfina
β-MSH
Met-encefalina

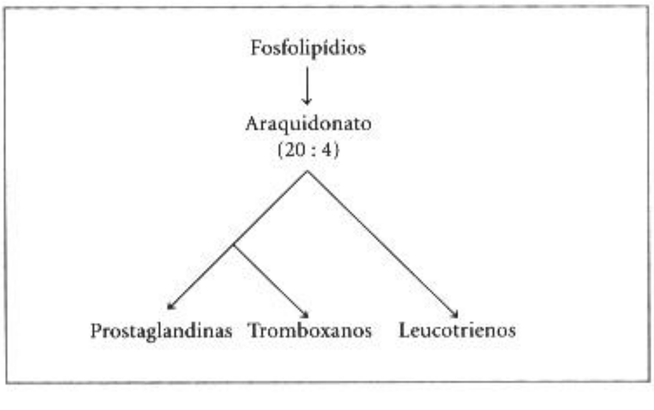
Figura 23-19 – Processamento proteolítico do precursor pró-opiomelanocortina (POMC). O produto inicial do gene POMC é um longo polipeptídeo que sofre uma série de clivagens por proteases específicas para produzir ACTH, β e γ-lipotrofina, α-MSH (hormônio estimulante dos melanócitos), β e γ-MSH, CLIP (peptídeo intermediário semelhante à corticotrofina), β-endorfina e Met-encefalina. Os pontos de clivagem são resíduos básicos pareados, como Arg–Lys, Lys–Arg, ou Lys–Lys.

A concentração dos hormônios peptídeos dentro dos grânulos de secreção é tão alta que os conteúdos são virtualmente cristalinos; quando o conteúdo de um grânulo é liberado por exocitose, uma grande quantidade do hormônio é liberada repentinamente. Os capilares que irrigam as glândulas endócrinas produtoras de peptídeos são fenestrados (mais finos que os usuais e permeáveis aos peptídeos), assim as moléculas secretadas do hormônio entram facilmente na corrente circulatória e são transportadas até as células-alvo. Todos os hormônios peptídeos atuam nas células-alvo por meio de receptores localizados na membrana plasmática. Eles promovem a formação de um segundo mensageiro no citosol (cAMP, Ca^{2+} etc.), que modifica a atividade de alguma enzima intracelular, alterando assim o metabolismo celular.

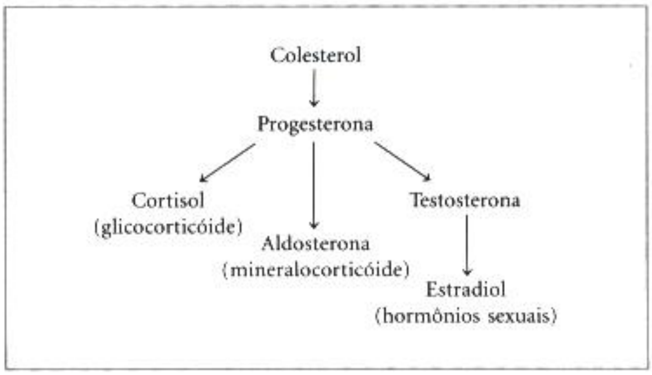
Hormônios catecolaminas. Os compostos solúveis em água adrenalina e noradrenalina são catecolaminas, sintetizadas a partir da tirosina e assim denominadas pela semelhança estrutural com o composto catecol. As catecolaminas produzidas no cérebro e em outros tecidos neurais funcionam como neurotransmissores, mas a adrenalina (epinefrina) e a noradrenalina (norepinefrina) são também produzidas e secretadas como hormônios pelas glândulas supra-renais. Semelhantes aos hormônios peptídeos, as catecolaminas estão muito concentradas dentro das vesículas de secreção, são liberadas por exocitose e podem atuar por meio de receptores de superfície para gerar mensageiros secundários intracelulares. Elas desencadeiam uma variedade de respostas fisiológicas ao estresse agudo (Tabela 23-2).



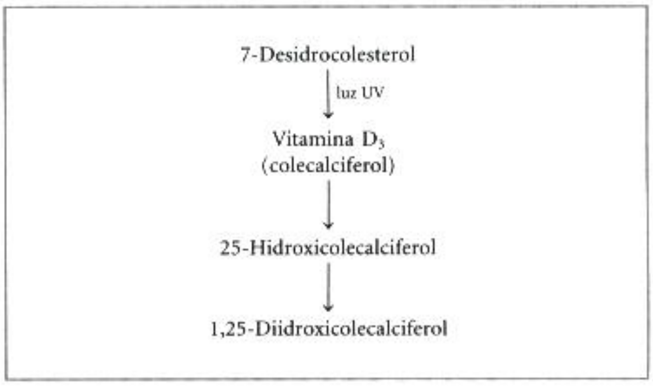
Eicosanóides. Os hormônios **eicosanóides** (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) são derivados do ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, o **araquidônico**. Eles não são sintetizados e estocados previamente, mas são produzidos, quando necessário, a partir do ácido araquidônico que foi enzimaticamente liberado dos fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A_2 (veja Fig. 11-16). As enzimas da via que produz prostaglandinas e tromboxanos (veja Fig. 21-16) são amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos; a maioria das células pode produzir esses sinais, e as células de muitos tecidos podem responder por meio de receptores específicos localizados na membrana plasmática. Os hormônios eicosanóides são secretados no fluido intersticial fora da célula (não primariamente no sangue) e atuam de modo parácrino nas células vizinhas. As prostaglandinas promovem a contração do músculo liso, incluindo o do intestino e útero (e podem por isso ser usadas para induzir o parto). Elas podem também mediar a dor e inflamação em todos os tecidos. As drogas antiinflamatórias atuam freqüentemente inibindo passos na via de síntese das prostaglandinas (veja Adendo 21-2). Os tromboxanos regulam a função das plaquetas e a coagulação do sangue. Os leucotrienos LTC_4 e LTD_4 estimulam a contração do músculo liso no intestino, vias pulmonares e traquéia e são mediadores da grave resposta imune chamada anafilaxia.



Hormônios esteróides. Os hormônios esteróides (adrenocorticais e sexuais) são sintetizados a partir do colesterol em vários tecidos endócrinos e são levados pela corrente sangüínea, ligados a proteínas carreadoras, até suas células-alvo. Mais que 50 hormônios corticosteróides de dois tipos gerais são produzidos no córtex supra-renal por meio de reações que removem a cadeia lateral do anel D do colesterol e introduzem oxigênio para formar os grupos ceto e hidroxil. Muitas dessas reações envolvem enzimas do citocromo P-450 (veja Adendo 21-1, pág. 610). Todos os hormônios esteróides agem por meio de receptores nucleares modificando o nível de expressão de genes específicos. Os glicocorticóides (como o cortisol) afetam primariamente o metabolismo de carboidratos; os mineralocorticóides (como a aldosterona) regulam a concentração de eletrólitos no sangue. Os andrógenos (testosterona) e os estrógenos (como o estradiol, veja Fig. 11-17) são sintetizados nos testículos e nos ovários e, em pequena proporção, no córtex supra-renal. A síntese desses hormônios também envolve as enzimas do citocromo P-450 que clivam a cadeia lateral do colesterol e introduzem átomos de oxigênio. Esses hormônios afetam o desenvolvimento e o comportamento sexual e uma variedade de outras funções reprodutivas e não-reprodutivas.



Hormônio vitamina D. Calcitriol (1,25-diidroxicolecalciferol) é produzido a partir da vitamina D por meio de enzimas de hidroxilação no fígado e nos rins (veja Fig. 11-18a). A vitamina D é obtida pela dieta ou por fotólise (pela luz solar) do 7-diidrocolesterol na pele. O calcitriol trabalha em conjunto com o hormônio da paratireóide na homeostase do Ca^{2+}, regulando a concentração do Ca^{2+} no sangue e o balanço entre o depósito e a mobilização de Ca^{2+} do osso. Agindo através de receptores nucleares, o calcitriol ativa a síntese de uma proteína intestinal ligadora de Ca^{2+}, essencial para a absorção do Ca^{2+} da dieta. Uma ingestão inadequada de vitamina D pela dieta ou defeitos na biossíntese de calcitriol resultam em doenças graves como o raquitismo, em que os ossos são fracos e malformados (veja Fig. 11-18b).



Hormônios retinóides. Os retinóides são potentes hormônios que regulam o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência celular por meio de receptores nucleares específicos. O pró-hormônio retinol é sintetizado primariamente no fígado a partir da vitamina A (veja Fig. 11-19), e muitos tecidos convertem o retinol no hormônio ácido retinóico (RA). Todos os tecidos são alvo dos retinóides, assim como todos os tipos celulares têm pelo menos uma forma de receptor nuclear para os retinóides. Em adultos, os principais tecidos-alvo incluem córnea, pele, epitélio do pulmão, traquéia e sistema imunológico. O RA regula a síntese de proteínas essenciais para o crescimento e a diferenciação.

β-Caroteno
↓
Vitamina A_1
(retinol)
↓
Ácido retinóico

Hormônios tireóideos. Os hormônios tireóideos T_4 (tiroxina) e T_3 (triiodotironina) são sintetizados na glândula tireóide a partir de uma proteína precursora, a tireoglobulina (*M*, 650.000). Dois resíduos de tirosina na tireoglobulina são enzimaticamente iodinados e ligados covalentemente; o T_4 e T_3 livres são liberados por proteólise. Os hormônios tireóideos estimulam o metabolismo energético, especialmente no fígado e no músculo, ativando a expressão de genes que codificam enzimas-chave catabólicas.

Tireoglobulina–Tyr
↓
Tireoglobulina–Tyr–I
(resíduos Tyr iodinados)
↓ proteólise
Tiroxina (T_4)
e
triiodotiroxina (T_3)

Óxido nítrico (NO). O óxido nítrico é um radical livre relativamente estável sintetizado a partir do oxigênio molecular e do nitrogênio guanidina da arginina (veja Fig. 22-29) em uma reação catalisada pela **NO sintase**. Essa enzima é encontrada em muitos tecidos e tipos celulares: neurônios, macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas, células endoteliais dos vasos sangüíneos e células epiteliais dos rins. O NO atua próximo ao local em que é liberado, entra na célula-alvo e ativa a enzima citosólica guanilato ciclase, a qual catalisa a formação do segundo mensageiro cGMP (veja Fig. 13-9).

O que regula os reguladores?

Os níveis dos vários hormônios regulam processos celulares específicos, mas o que regula o nível de cada hormônio? A resposta mais curta é que o sistema nervoso central recebe informações de muitos sensores internos e externos — por exemplo, sinais de perigo, fome, ingestão alimentar, composição e pressão do sangue — e organiza a produção de sinais hormonais apropriados pelos vários tecidos endócrinos do corpo. Para uma resposta mais completa, precisamos analisar os principais sistemas produtores de hormônios do corpo humano e algumas de suas inter-relações funcionais.

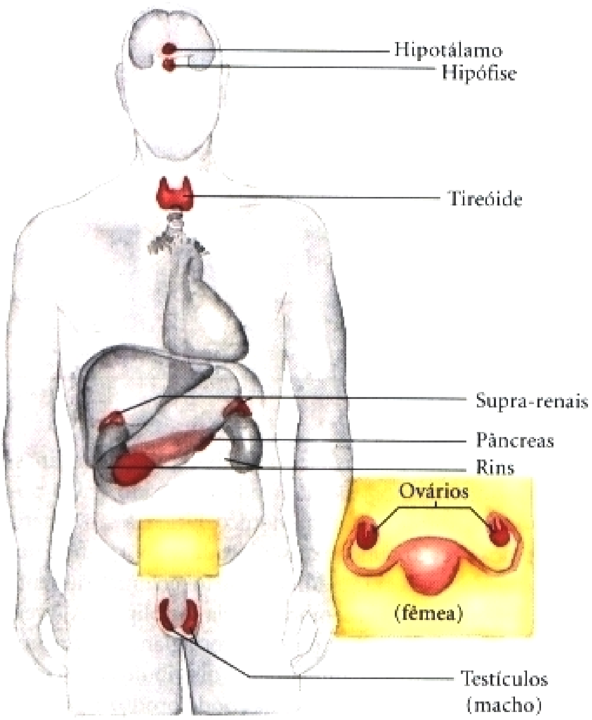


Figura 23-20 – As principais glândulas endócrinas (em vermelho claro).

A Figura 23-20 mostra a localização anatômica das principais glândulas endócrinas no homem e a Figura 23-21 representa a "cadeia de comando" na hierarquia de sinalização hormonal. O **hipotálamo** no cérebro (Fig. 23-22) é o centro de coordenação do sistema endócrino; ele recebe e integra mensagens do sistema nervoso central. Em resposta a essas mensagens, o hipotálamo produz numerosos hormônios regulatórios (fatores liberadores), que passam diretamente para a glândula hipófise (ou pituitária) através de neurônios e vasos sangüíneos especiais que conectam as duas glândulas (Fig. 23-22b). A glândula hipófise tem duas partes funcionalmente distintas. A **hipófise posterior** contém as terminações axonais de muitos neurônios que se originam no hipotálamo. Esses neurônios produzem hormônios peptídeos pequenos, a ocitocina e a vasopressina (Fig. 23-23), os quais se movem pelos axônios para as terminações nervosas na hipófise, onde são estocados em grânulos de secreção, à espera do sinal para sua liberação.

A **hipófise anterior** responde aos hormônios hipotalâmicos trazidos pelo sangue produzindo os **hormônios tróficos** ou **trofinas** (do grego *tropos*, que significa "transformar", "mudar"). Esses polipeptídeos relativamente longos ativam a próxima fileira de glândulas endócrinas (Fig. 23-21), a qual inclui o córtex supra-renal, a glândula tireóide, os ovários e os testículos. Essas glândulas, por sua vez, são estimuladas a secretar seus hormônios específicos, os quais são levados pelo sangue até os receptores hormonais localizados nas células dos seus tecidos-alvo. Por exemplo, o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) do hipotálamo estimula a hipófise anterior a liberar o ACTH, o qual age no córtex supra-renal (camada externa da glândula supra-renal) e desencadeia a liberação do cortisol. O cortisol, o último hormônio dessa cascata, atua por meio de seus receptores em muitos tipos de células-alvo para alterar seu metabolismo. Em hepatócitos, uma das ações do cortisol é aumentar a velocidade da gliconeogênese.

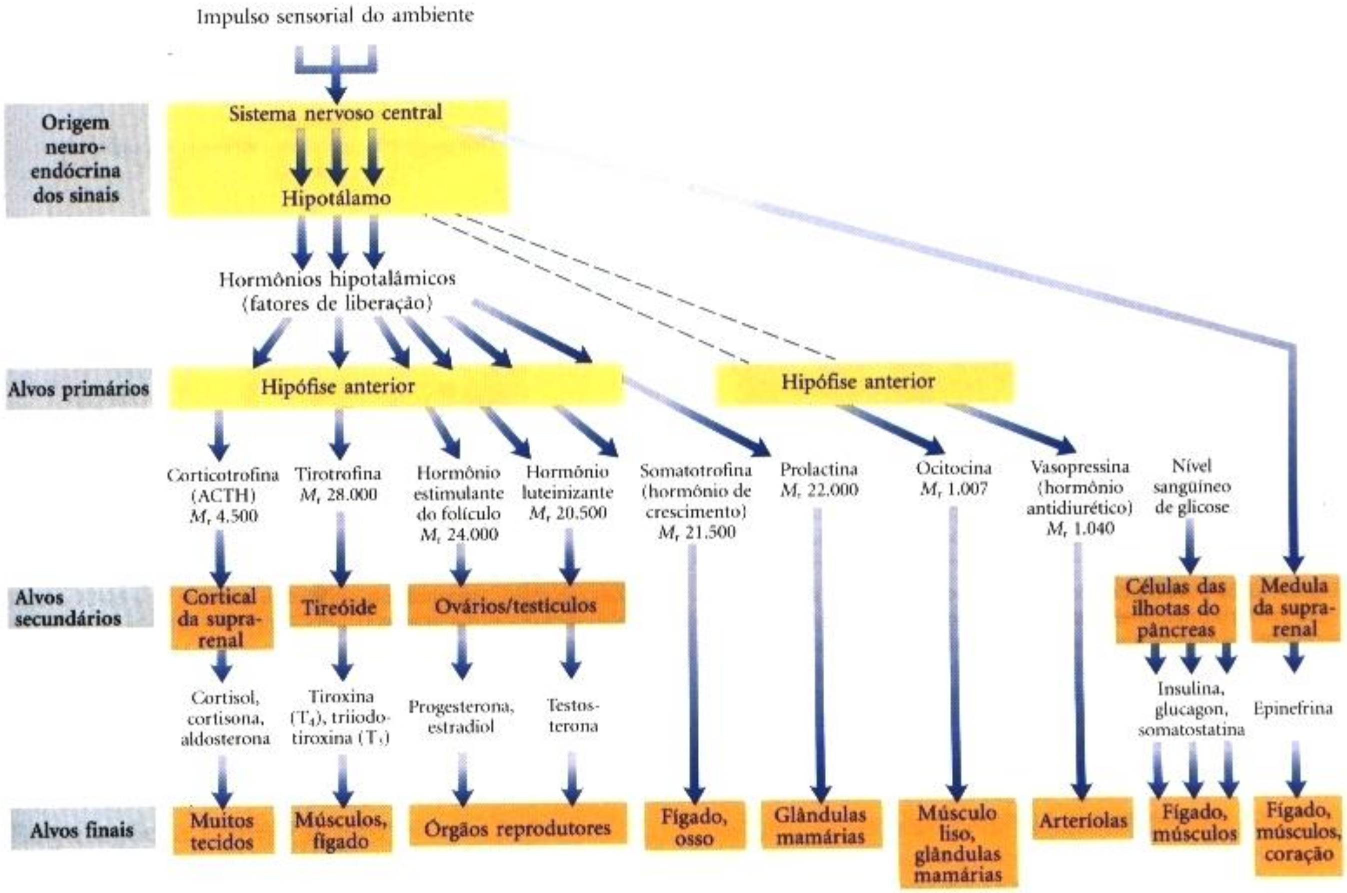

Impulso sensorial do ambiente
Origem neuro-endócrina dos sinais
Sistema nervoso central
Hipotálamo
Hormônios hipotalâmicos (fatores de liberação)
Alvos primários
Hipófise anterior
Hipófise anterior
Corticotrofina (ACTH) M_r 4.500
Tirotrofina M_r 28.000
Hormônio estimulante do folículo M_r 24.000
Hormônio luteinizante M_r 20.500
Somatotrofina (hormônio de crescimento) M_r 21.500
Prolactina M_r 22.000
Ocitocina M_r 1.007
Vasopressina (hormônio antidiurético) M_r 1.040
Nível sangüíneo de glicose
Alvos secundários
Cortical da supra-renal
Tireóide
Ovários/testículos
Células das ilhotas do pâncreas
Medula da supra-renal
Cortisol, cortisona, aldosterona
Tiroxina (T_4), triiodo-tiroxina (T_3)
Progesterona, estradiol
Testos-terona
Insulina, glucagon, somatostatina
Epinefrina
Alvos finais
Muitos tecidos
Músculos, fígado
Órgãos reprodutores
Fígado, osso
Glândulas mamárias
Músculo liso, glândulas mamárias
Arteríolas
Fígado, músculos
Fígado, músculos, coração

Figura 23-21 – Os principais sistemas endócrinos e seus tecidos-alvo. Os sinais originários do sistema nervoso central (em cima) passam através de uma série de relés para os alvos finais (embaixo). Além dos sistemas mostrados, o timo e a glândula pineal, bem como um grupo de células no trato gastrointestinal, também secretam hormônios.

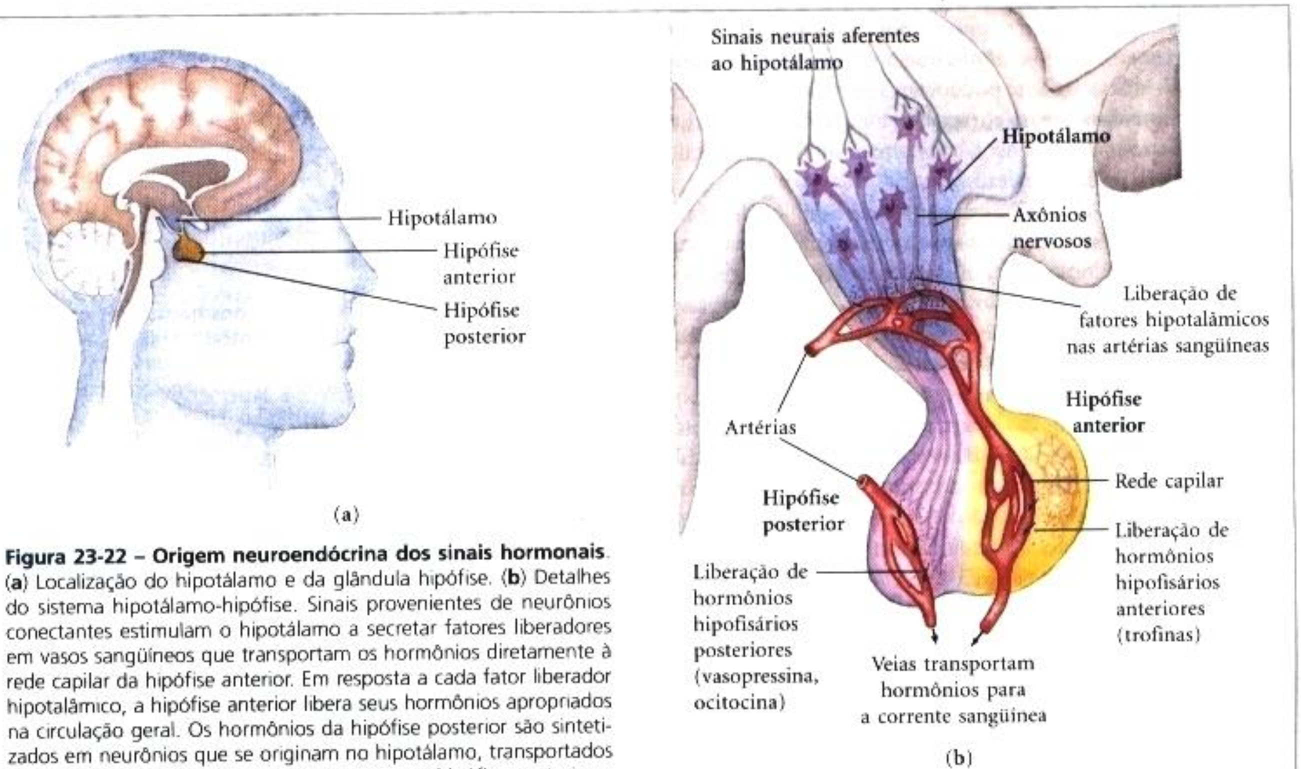

Hipotálamo
Hipófise anterior
Hipófise posterior
(a)
Sinais neurais aferentes ao hipotálamo
Hipotálamo
Axônios nervosos
Liberação de fatores hipotalâmicos nas artérias sangüíneas
Hipófise anterior
Artérias
Rede capilar
Hipófise posterior
Liberação de hormônios hipofisários anteriores (trofinas)
Liberação de hormônios hipofisários posteriores (vasopressina, ocitocina)
Veias transportam hormônios para a corrente sangüínea
(b)

Figura 23-22 – Origem neuroendócrina dos sinais hormonais. (**a**) Localização do hipotálamo e da glândula hipófise. (**b**) Detalhes do sistema hipotálamo-hipófise. Sinais provenientes de neurônios conectantes estimulam o hipotálamo a secretar fatores liberadores em vasos sangüíneos que transportam os hormônios diretamente à rede capilar da hipófise anterior. Em resposta a cada fator liberador hipotalâmico, a hipófise anterior libera seus hormônios apropriados na circulação geral. Os hormônios da hipófise posterior são sintetizados em neurônios que se originam no hipotálamo, transportados em axônios para as extremidades nervosas na hipófise posterior e armazenados aí até que sejam liberados na corrente sangüínea, em resposta a um sinal neuronal.

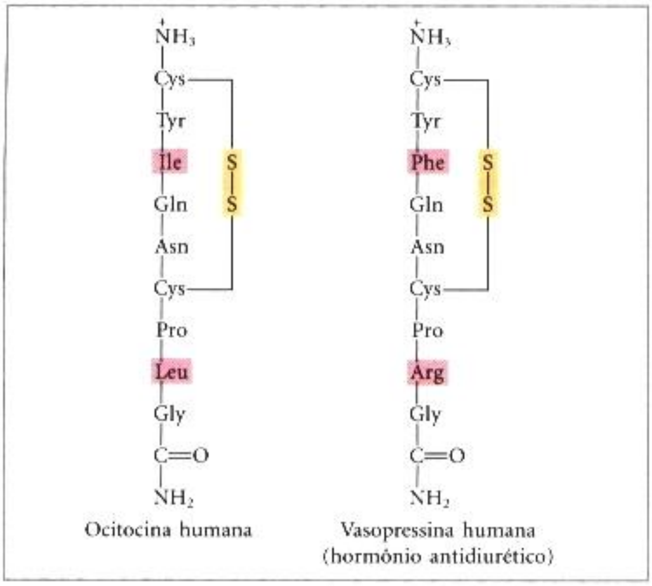


Figura 23-23 – Dois hormônios da glândula hipófise posterior. Os resíduos carboxiterminais são a glicinamida (—NH—CH_2—$CONH_2$); a amidação do carboxiterminal é comum em hormônios peptídicos curtos. Esses dois hormônios, idênticos em todos os resíduos, exceto dois (sombreados), apresentam efeitos biológicos muito diferentes. A ocitocina age no músculo liso do útero e das glândulas mamárias, causando a contração uterina durante o parto e promovendo a liberação do leite durante a lactação. A vasopressina (VP, também chamada de hormônio antidiurético, ADH) aumenta a reabsorção de água no rim e a constrição dos vasos sangüíneos, aumentando assim a pressão arterial.

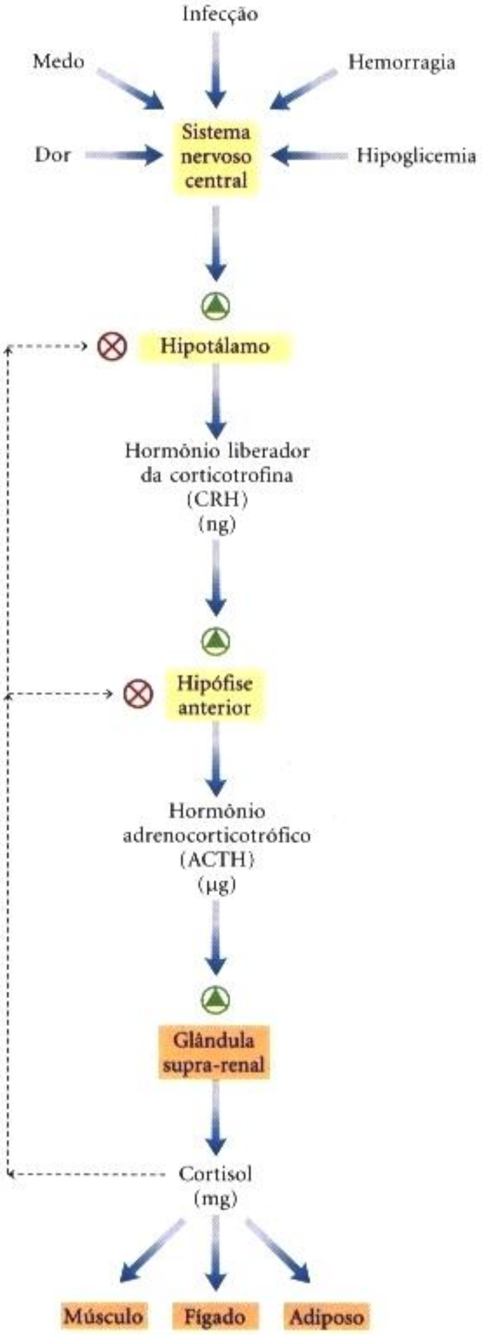


Figura 23-24 – Cascata de liberação dos hormônios que se segue aos impulsos do sistema nervoso central ao hipotálamo. Ao longo da via, em cada tecido endócrino um estímulo de um nível superior é recebido, amplificado e sua transdução leva à liberação do próximo hormônio na cascata. A cascata é sensível à regulação em vários níveis por inibição de retroalimentação pelo último hormônio. O produto, por isso, controla sua própria produção, assim como ocorre nas vias biossintéticas dentro de uma célula.

As cascatas hormonais, tais como aquelas responsáveis pela liberação do cortisol e da adrenalina, resultam em grande amplificação do sinal inicial e permitem um ajuste fino adequado na liberação desses últimos hormônios (Fig. 23-24). A cada nível da cascata, um sinal pequeno resulta em uma resposta maior. O sinal elétrico inicial para o hipotálamo resulta na liberação de poucos *nanogramas* do hormônio liberador da corticotrofina, o qual promove a liberação de poucos *microgramas* de corticotrofina. A corticotrofina age no córtex supra-renal causando a liberação de *miligramas* de cortisol, com uma amplificação total de pelo menos um milhão de vezes.

A cada nível da cascata hormonal, há a possibilidade de uma inibição por retroalimentação dos passos mais iniciais da cascata; níveis elevados do último hormônio ou de um dos hormônios intermediários inibem a liberação dos hormônios mais iniciais da cascata, do hipotálamo ou da hipófise. Esses mecanismos de retroalimentação realizam os mesmos objetivos que os mecanismos alostéricos que limitam a velocidade de uma via biossintética (comparar a Fig. 23-24 com a Fig. 8-25): um produto é feito (ou liberado) somente até que sua concentração necessária tenha sido alcançada.

Nem todas as células que produzem hormônios fazem parte de cascatas tão longas. A liberação da insulina pelo pâncreas, por exemplo, é regulada principalmente pelos níveis de glicose no sangue que supre o pâncreas (Fig. 23-21). Os hormônios peptídeos insulina, glucagon e somatostatina são produzidos por agrupamentos de células especializadas do pâncreas, as ilhotas de Langerhans (Fig. 23-25). Cada tipo celular da ilhota produz um único hormônio: as células α produzem glucagon; as células β, insulina; e as células δ, a somastotatina. Quando a glicose no sangue aumenta, ela é transportada eficientemente na célula β, é imediatamente convertida em glicose-6-fosfato pela glicoquinase e entra na glicólise. A taxa aumentada do catabolismo da glicose promove (por mecanismos não totalmente conhecidos) a entrada de Ca^{2+} através de canais na membrana plasmática, desencadeando a liberação da insulina por exocitose. Estímulos do sistema nervoso parassimpático e simpático também ativam ou inibem a liberação da insulina, respectivamente. A concentração da glicose no sangue, o fator mais importante regulado pela insulina, é por si só o fator primário que desencadeia a liberação da insulina. Uma simples alça de retroalimentação limita a liberação do hormônio: a insulina diminui a glicose sangüínea estimulando a sua captação pelos tecidos; a redução da glicose no sangue é detectada pela célula β como uma diminuição do fluxo por meio da reação da glicoquinase; isso diminui ou bloqueia a liberação da insulina.

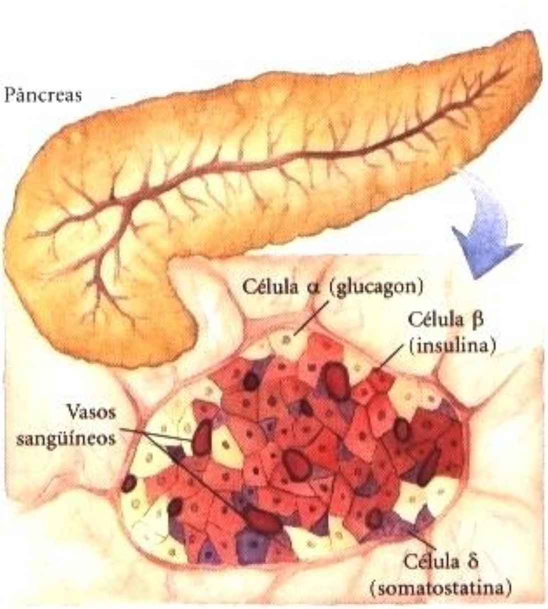


Figura 23-25 – O sistema endócrino do pâncreas. Além das células exócrinas ou acinares (veja Fig. 17-3b), que secretam as enzimas digestivas na forma de zimogênios, o pâncreas contém tecido endócrino consistindo de ilhotas de Langerhans. As ilhotas contêm as células α, β e δ (também conhecidas como células A, B e D, respectivamente), cada uma secretando um hormônio polipeptídeo específico.

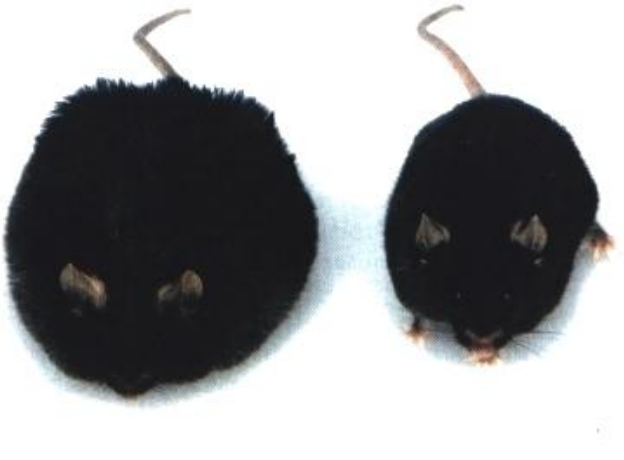


Figura 23-26 – Um defeito na produção de leptina leva à obesidade. Estes dois camundongos têm defeitos no gene obeso e são da mesma idade. O camundongo da direita foi tratado com injeções diárias de leptina purificada e pesa 35 gramas. O camundongo da esquerda não recebeu leptina, conseqüentemente, comia mais e era menos ativo e pesa 67 gramas.

Regulação a Longo Prazo da Massa Corporal

Os ajustes metabólicos desencadeados pela insulina, glucagon e adrenalina ocorrem em uma escala curta de tempo—segundos ou minutos. Outros mecanismos regulatórios atuam em uma escala de tempo mais longa, controlando a alimentação e o gasto energético de uma maneira que mantêm o corpo do mamífero em homeostasia. Entre as idades de 25 e 55 anos, o homem norte-americano ganha em média 9kg, correspondendo a uma ingestão, nesse período de 30 anos, de poucos décimos de porcentagem a mais de calorias por dia do que são gastas. Isto é uma regulação consideravelmente precisa! Contudo, o leve desequilíbrio em favor do ganho de peso pode ser prejudicial à saúde. A expectativa de vida cai quando o tecido adiposo se torna uma fração muito grande da massa corporal total. Conseqüentemente, há um grande interesse no entendimento de como são regulados a massa corporal e o estoque de gordura no tecido adiposo.

A leptina foi prevista pela teoria lipostática

A teoria lipostática, desenvolvida para explicar a constância relativa do peso corporal, postula um mecanismo de retroalimentação que inibe o comportamento alimentar e aumenta o consumo de energia quando o peso corporal excede um certo valor ("set point"); a inibição é liberada quando o peso corporal cai abaixo desse valor. Essa teoria prevê que um sinal de retroalimentação que se origina no tecido adiposo poderia influenciar os centros cerebrais que controlam o comportamento e a atividade alimentar (metabólica e motora). Tal fator foi descoberto em 1994. A **leptina** (do grego *leptos*, fino), produzida nos adipócitos, é uma proteína pequena (167 resíduos de aminoácidos), que se move através do sangue até o cérebro, onde atua nos receptores do hipotálamo para diminuir o apetite.

A leptina foi identificada como o produto de um gene designado *OB* (obeso) em camundongos de laboratório. Os camundongos com duas cópias defeituosas (genótipo *ob/ob*; as letras minúsculas significam uma forma mutante do gene) apresentam o comportamento e a fisiologia de animais em um estado constante de jejum: seus níveis séricos de corticosterona são elevados; são incapazes de permanecer aquecidos, de crescer normalmente, de se reproduzir e de limitar seu apetite. Em conseqüência desta última condição, eles se tornam patologicamente obesos, pesando até três vezes mais que os camundongos normais (Fig. 23-26). Eles também apresentam distúrbios metabólicos muito semelhantes àqueles dos animais diabéticos e são resistentes à insulina. Quando a leptina é injetada em camundongos *ob/ob*, eles perdem peso e aumentam sua atividade locomotora e a produção de calor. Verificou-se que um segundo gene de camundongo, designado *DB* (diabético) também tem um papel na regulação do apetite. Os camundongos com duas cópias defeituosas (*db/db*) são obesos e diabéticos. Foi descoberto que o gene *DB* codifica o **receptor da leptina**. Quando o receptor da leptina é defeituoso, a função de sinalização da leptina é perdida.

A leptina é produzida somente nos adipócitos e, em quantidades muito menores, no epitélio intestinal e na placenta. O receptor da leptina é expresso primariamente em regiões do cérebro conhecidas na regulação do comportamento alimentar, neurônios dos núcleos arqueado, ventromedial e dorsomedial do hipotálamo (Fig. 23-27a). O receptor também é expresso em células do córtex supra-renal e nas células β-pancreáticas, mas em níveis muito baixos.

A leptina transporta a mensagem que as reservas de gordura são suficientes e promove a redução na ingestão de metabólitos e o aumento no gasto de energia. A interação da leptina com seu receptor no hipotálamo altera a liberação de sinais que afetam o apetite. A leptina também estimula o sistema nervoso simpático, aumentando a pressão sangüínea, a freqüência cardíaca e a termogênese (a produção de calor à custa da energia metabólica), pelo desacoplamento da transferência de elétrons da síntese de ATP na mitocôndria do tecido adiposo (Fig. 23-27b).

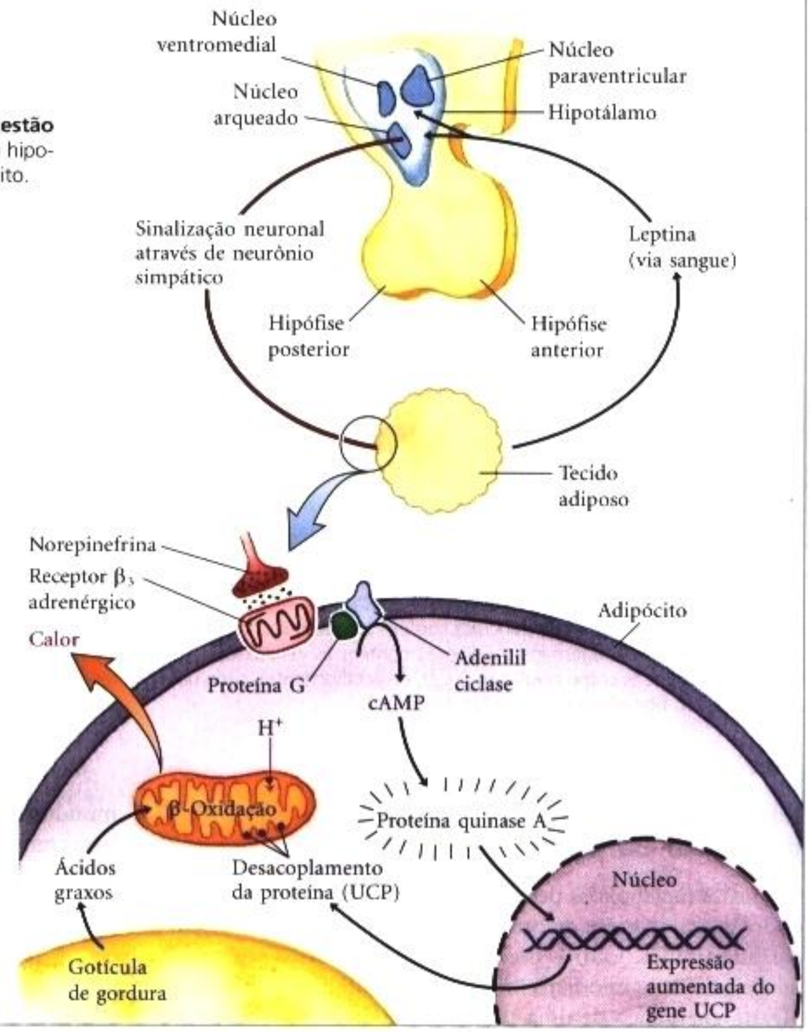

Núcleo ventromedial
Núcleo paraventricular
Núcleo arqueado
Hipotálamo
Sinalização neuronal através de neurônio simpático
Leptina (via sangue)
Hipófise posterior
Hipófise anterior
Tecido adiposo
Norepinefrina
Receptor β_3 adrenérgico
Calor
Adipócito
Adenilil ciclase
Proteína G
cAMP
H^+
β-Oxidação
Proteína quinase A
Ácidos graxos
Desacoplamento da proteína (UCP)
Núcleo
Gotícula de gordura
Expressão aumentada do gene UCP

Figura 23-27 – O hipotálamo na regulação da ingestão alimentar e no gasto de energia. (**a**) Anatomia do hipotálamo. (**b**) Interações entre o hipotálamo e o adipócito.

Muitos fatores regulam o comportamento alimentar e o gasto de energia

A leptina não é o único hormônio que regula o comportamento alimentar ou o peso corporal. A secreção de insulina reflete tanto o tamanho das reservas lipídicas (adiposidade) como o equilíbrio de energia vigente (níveis de glicose no sangue). A insulina atua em seus receptores no hipotálamo para inibir a alimentação; o que também sinaliza para o músculo, o fígado e o tecido adiposo para aumentar as reações catabólicas, incluindo a oxidação das gorduras, que pode levar à perda de peso. Vários neuropeptídeos **anorexígenos** (supressores do apetite) têm sido bem caracterizados: hormônio estimulante dos melanócitos α (α-MSH), produzido no hipotálamo a partir do precursor polipeptídeo pró-opiomelanocortina (POMC; veja Fig. 23-19); hormônio liberador da corticotrofina (CRH), produzido no núcleo paraventricular; e o peptídeo hipotalâmico CART (transcrito regulado por cocaína e anfetamina) (Fig. 23-28). Os glicocorticóides suprarenais são também muito importantes; a adrenalectomia (remoção cirúrgica da glândula adrenal) reverte ou impede todas as formas de obesidade.

Metabolicamente do lado oposto está o neuropeptídeo Y (NPY), um peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos produzido no núcleo arqueado do hipotálamo. NPY é **orexígeno** (estimulador do apetite) e reduz a termogênese. Sua secreção e ação são reguladas pela leptina e neuropeptídeos tais como a melanocortina, CRH, e o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1). O nível sangüíneo do NPY aumenta durante o jejum e encontra-se elevado nos camundongos *ob/ob* e *db/db*; ele presumivelmente é responsável pela obesidade desses camundongos, atingindo níveis que são perigosamente altos na ausência do controle pelo sistema da leptina.

A leptina desencadeia uma cascata regulatória

O modelo atual de ação da leptina é uma cascata de eventos regulatórios desencadeados pela interação da leptina com seu receptor, afetando os níveis de vários hormônios da cascata que estimulam ou inibem o comportamento alimentar e o gasto energético. A quantidade de leptina liberada pelo tecido adiposo depende do número e do tamanho dos adipócitos.

A transdução do sinal da leptina é feita por um mecanismo idêntico ao utilizado pelos receptores do interferon e dos fatores de crescimento, o chamado sistema JAK/STAT (Fig. 23-29). O receptor da leptina tem um único segmento transmembrana e dimeriza quando a leptina se liga ao seu domínio extracelular. Ambos os monômeros do receptor dimérico são fosforilados em um resíduo de tirosina do domínio intracelular por uma Janus quinase (JAK). Os resíduos de fosfotirosina tornam-se âncoras para três proteínas que são transdutoras do sinal e ati-

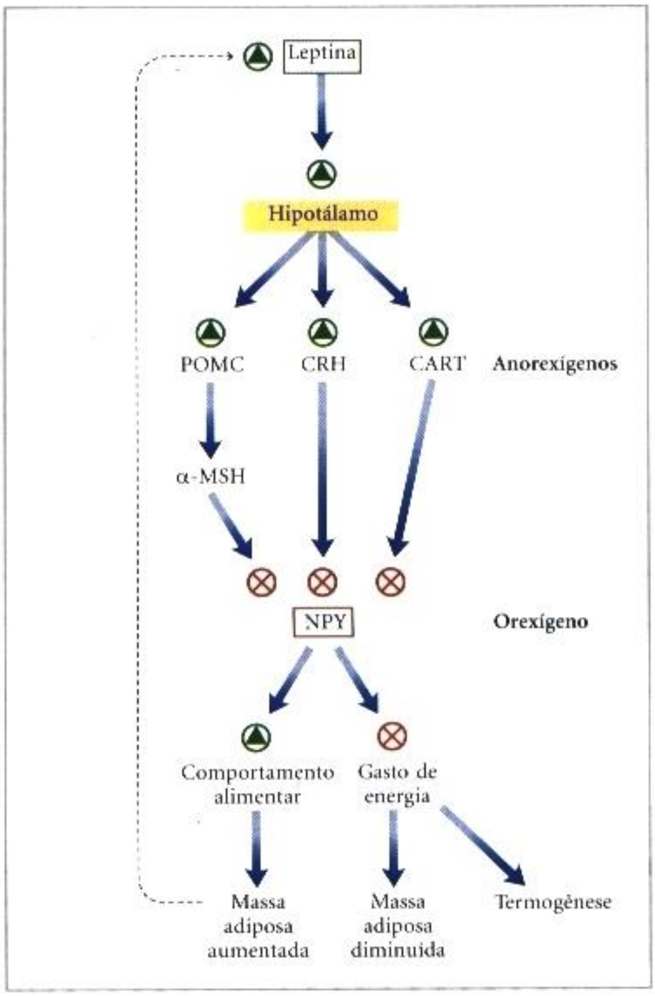

Leptina
Hipotálamo
POMC
CRH
CART
Anorexígenos
α-MSH
NPY
Orexígeno
Comportamento alimentar
Gasto de energia
Massa adiposa aumentada
Massa adiposa diminuída
Termogênese

Figura 23-28 – A cascata da leptina. Uma ilustração do papel do hipotálamo no comportamento alimentar e na atividade metabólica.

vadoras da transcrição (STATs 3, 5 e 6, algumas vezes chamadas lipo-STATS). As STATS ancoradas são então fosforiladas em resíduos de tirosina pela mesma Janus quinase (por isso o nome Janus — semelhante à figura mitológica, a quinase tem duas "faces"). Após a fosforilação pela JAK, as STATs movimentam-se para o núcleo, onde se ligam a seqüências específicas do DNA e estimulam a expressão de genes-alvo específicos. A expressão dos genes para NPY, CRH e o precursor POMC (que fornece o α-MSH) é regulada pela leptina por meio desse mecanismo. A expressão do gene POMC é também regulada (suprimida) pelos hormônios glicocorticóides; claramente há uma inter-relação complexa entre os vários fatores que influenciam a síntese e a ação dos neuropeptídeos.

O catabolismo aumentado e a termogênese desencadeados pela leptina devem-se em parte à síntese aumentada da proteína desacopladora mitocondrial UCP-1 nos adipócitos. Lembre-se de que essa proteína forma um canal que permite que os prótons entrem novamente na matriz mitocondrial sem passar pelo complexo da ATP sintase (veja Fig. 19-28). Isso permite uma oxidação contínua dos metabólitos (ácidos graxos em um adipócito) sem a síntese de ATP, dissipando energia como calor, potencialmente consumindo calorias da dieta ou estocando gordura em quantidades muito grandes. A leptina estimula a síntese da UCP-1 ao alterar a transmissão sináptica de neurônios do núcleo arqueado, hiperpolarizando certos neurônios hipotalâmicos. Pela estimulação de neurônios simpáticos que se originam no hipotálamo, a leptina promove um aumento da liberação de noradrenalina nas sinapses com os adipócitos. A noradrenalina atua por meio de receptores β_3-adrenérgicos estimulando a transcrição do gene para UCP; o desacoplamento resultante da transferência de elétrons da fosforilação oxidativa é termogênica (Fig. 23-27).

Poderia a obesidade humana resultar da produção insuficiente da leptina e, assim, ser tratada com a injeção de leptina? Os níveis sangüíneos da leptina estão, de fato, geralmente muito mais

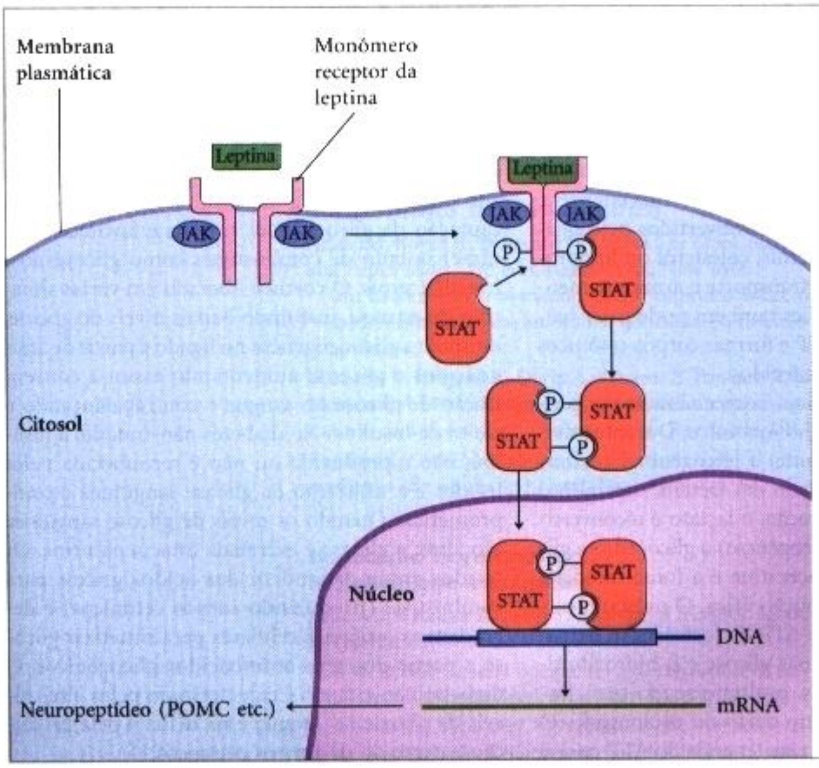

Membrana plasmática
Monômero receptor da leptina
Leptina
JAK
JAK
Leptina
JAK
JAK
P
P
STAT
STAT
P
STAT
STAT
P
Citosol
P
STAT
STAT
P
Núcleo
DNA
Neuropeptídeo (POMC etc.)
mRNA

Figura 23-29 – Transdução do sinal da leptina no hipotálamo pelo mecanismo da JAK-STAT. A ligação da leptina induz a dimerização do seu receptor, seguida pela fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor, catalisada pela Janus quinase (JAK). STATs que se ligam ao receptor fosforilado da leptina são então fosforilados em resíduos de tirosina por uma atividade separada da JAK. Os STATs dimerizam-se, ligam-se um ao outro por meio dos resíduos Tyr–Ⓟ e entram no núcleo, onde se ligam em regiões específicas regulatórias no DNA e alteram a expressão de genes específicos. Os produtos desses genes influenciam finalmente o comportamento alimentar e o gasto de energia.

altos em animais obesos (incluindo o homem) do que em animais com massa corporal normal (exceto, naturalmente, nos animais *ob/ob*, que não podem produzir leptina). Em casos muito raros de obesidade extrema no homem, quando se descobre que o gene da leptina é defeituoso, a injeção de leptina tem resultado em dramática perda de peso. Nos animais com genes *OB* intactos, contudo, o nível de leptina aumenta com a quantidade de tecido adiposo. Em experiências clínicas, a injeção de leptina não apresenta o efeito dramático de redução de peso que ela apresenta em camundongos obesos *ob/ob* no laboratório. Outras explicações possíveis para a obesidade mórbida incluem defeitos no receptor e na transdução do sinal da leptina, ou na interação do sistema da leptina com outros sistemas envolvidos na manutenção da massa corporal. Todas essas possibilidades estão sendo investigadas.

O sistema da leptina pode ter sido originado para regular a resposta de jejum

Embora muito do interesse da leptina resulte de seu possível papel na prevenção da obesidade, o sistema da leptina provavelmente se originou para ajustar a atividade e o metabolismo do animal durante períodos de jejum curto ou prolongado. A redução nos níveis de leptina desencadeada pela deficiência nutricional promove uma produção diminuída dos hormônios tireóideos (diminuindo o metabolismo basal), dos hormônios sexuais (impedindo a reproducão) e uma produção aumentada de glicocorticóides (mobilizando as reservas corporais que geram energia). As respostas mediadas pela leptina, de minimizar os gastos de energia e maximizar o uso de reservas endógenas de energia, permitem ao animal sobreviver durante períodos de privação nutricional prolongada.

Resumo

Nos mamíferos há uma divisão de trabalho metabólico entre tecidos especializados e órgãos. A coordenação das diversas atividades metabólicas do organismo é acompanhada por sinais hormonais que circulam no sangue. O fígado é o órgão central na distribuição e processamento dos nutrientes. Os açúcares e os aminoácidos, produzidos na digestão, atravessam o epitélio intestinal e entram no sangue, que os transporta para o fígado. Alguns triacilgliceróis derivados dos lipídios digeridos também vão para o fígado, onde os constituintes ácidos graxos são usados em uma variedade de processos. A glicose-6-fosfato é o intermediário-chave no metabolismo dos carboidratos. Ela pode ser polimerizada em glicogênio, desfosforilada até glicose sangüínea, ou convertida em ácidos graxos via acetil-CoA. Ela pode sofrer degradação pela glicólise e pelo ciclo do ácido cítrico, produzindo a energia do ATP, ou pela via da pentose fosfato, produzindo pentoses e NADPH. Os aminoácidos são usados para sintetizar as proteínas do fígado e do plasma ou os seus esqueletos carbônicos podem ser convertidos em glicose e glicogênio pela gliconeogênese; a amônia formada por sua deaminação é convertida em uréia. Os ácidos graxos podem ser convertidos pelo fígado em outros triacilgliceróis, colesterol ou lipoproteínas plasmáticas para transporte e armazenamento no tecido adiposo. Eles também podem ser oxidados para produzir ATP e formar corpos cetônicos para circular em outros tecidos.

O músculo esquelético é especializado em produzir ATP para o trabalho mecânico. Durante atividade muscular extenuante, o glicogênio é o combustível final e fermentado em lactato, suprindo o ATP. Durante a recuperação, o lactato é reconvertido (por meio da gliconeogênese) a glicogênio e glicose no fígado. A fosfocreatina é a fonte imediata do ATP durante a contração ativa. O músculo cardíaco obtém todo o seu ATP da fosforilação oxidativa. O cérebro usa apenas glicose e β-hidroxibutirato como combustíveis, o último sendo mais importante durante o jejum curto ou prolongado. O cérebro usa a maioria da sua energia do ATP para o transporte ativo do Na^+ e K^+ e para a manutenção do potencial elétrico das membranas neuronais. O sangue une todos os órgãos, transportando nutrientes, produtos residuais e sinais hormonais entre eles.

A concentração da glicose no sangue é hormonalmente regulada. Flutuações na glicose sangüínea (que é normalmente 60 a 90mg/100ml ou cerca de 4,5mM) devido à ingestão alimentar ou ao exercício vigoroso são contrabalançadas por uma variedade de alterações desencadeadas por hormônios no metabolismo de vários órgãos. A adrenalina prepara o organismo para aumentar a sua atividade mobilizando a glicose sangüínea a partir do glicogênio e outros precursores. A glicose sangüínea baixa leva à liberação do glucagon, que estimula a liberação de glicose a partir do glicogênio hepático e desloca o metabolismo energético no fígado e nos músculos para ácidos graxos, poupando a glicose para uso pelo cérebro. No jejum prolongado, os triacilgliceróis tornam-se os combustíveis principais; o fígado converte os ácidos graxos em corpos cetônicos para a exportação para outros tecidos, incluindo o cérebro. A glicose sangüínea alta induz a liberação da insulina, que aumenta a captação da glicose pelos tecidos e favorece o armazenamento de combustíveis como glicogênio e triacilgliceróis. O cortisol liberado em várias situações de estresse, incluindo baixos níveis de glicose, estimula a gliconeogênese no fígado a partir de aminoácidos e glicerol, aumentando assim a concentração de glicose no sangue e contrabalançando o efeito da insulina. No diabetes não-tratado, a insulina não é produzida ou não é reconhecida pelos tecidos e a utilização da glicose sangüínea é comprometida. Quando os níveis de glicose sangüínea são altos, a glicose é excretada intacta na urina. Os tecidos então dependem dos ácidos graxos para combustível (produzindo corpos cetônicos) e degradam as proteínas celulares para sintetizar glicose a partir dos seus aminoácidos glicogênicos. O diabetes não-tratado é caracterizado pelos altos níveis de glicose no sangue e na urina e pela produção e excreção de corpos cetônicos.

Os hormônios são mensageiros químicos secretados por certos tecidos no sangue ou fluidos intersticiais, servindo para regular a atividade dos outros tecidos. Radioimunoensaio (RIA) e ELISA são duas técnicas muito sensíveis para detectar e quantificar hormônios. As cascatas hormonais, nas quais catalisadores ativam catalisadores, amplificam os estímulos iniciais em várias ordens de magnitude, freqüentemente em escala de tempo muito curta (segundos). Os impulsos nervosos estimulam o hipotálamo a enviar hormônios específicos à glândula hipófise, estimulando (ou inibindo) a liberação de hormônios tróficos. Os hormônios da hipófise anterior, por sua vez, estimulam outras glândulas endócrinas (tireóide, supra-renais, pâncreas) a secretar seus hormônios característicos, que por sua vez estimulam tecidos-alvo específicos. Os hormônios peptídeos, aminas e eicosanóides atuam nas células-alvo por meio de receptores específicos na membrana que alteram os níveis de mensageiros secundários intracelulares, tais como o cAMP. Os esteróides, vitamina D, retinóides e hormônios tireóideos entram nas células-alvo e alteram a expressão gênica interagindo com receptores nucleares específicos.

O tecido adiposo produz um hormônio, a leptina, que regula o comportamento alimentar e o gasto de energia para a manutenção da massa corporal aproximadamente constante. A produção e a liberação da leptina aumentam com o número e o tamanho dos adipócitos. A leptina atua em receptores no hipotálamo causando a síntese e a liberação de vários neuropeptídeos que modulam a ingestão de alimentos e a atividade metabólica. Esses incluem os peptídeos anorexígenos α-MSH, CRH e CART. Esses peptídeos e outros influenciam a ação do neuropeptídeo Y (NPY) orexígeno (estimulador do apetite). A leptina também estimula a ação do sistema nervoso simpático nos adipócitos, promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial com conseqüente termogênese. O mecanismo de transdução do sinal da leptina envolve a fosforilação do receptor e dos transdutores do sinal e ativadores da transcrição (STATs) pela Janus quinase (JAK). A fosforilação permite que os STATs se liguem a regiões regulatórias no DNA nuclear e alterem as taxas de transcrição de genes que codificam proteínas, que ajustam o nível de atividade metabólica e determinam o comportamento alimentar. A liberação da leptina pelo tecido adiposo é reduzida durante os períodos de jejum; as mudanças resultantes na liberação de neuropeptídeos levam a uma atividade locomotora reduzida, à termogênese e restringem a reprodução, economizando reservas energéticas para as funções essenciais para a sobrevivência.

Leitura Adicional

História e antecedentes gerais

Crapo L. (1985) *Hormones: The Messengers of Life*. W.H. Freeman and Company, New York.

Um relato curto e interessante da história e do estado atual da pesquisa hormonal.

Litwack G & Norman AW. (1997) *Hormones*, 2nd edn, Academic Press, Orlando

Uma introdução excelente, clara e bem ilustrada sobre a estrutura, síntese e ação de hormônios.

Yalow RS. (1978) Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. *Science* **200**, 1236-1245.

Uma história do desenvolvimento do radioimunoensaio; a conferência Nobel do autor.

Metabolismo tecido-específico

Arias IM, Boyer JL, & Fausto N. (1994) *The Liver: Biology and Pathobiology*, 3rd edn, Raven Press, New York.

Um livro de texto avançado; inclui capítulos sobre o metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas no fígado.

Nosadini R, Avogaro A, Doria A, Fioretto P, Trevisan R, & Morocutti A. (1989) Ketone body metabolism: a physiological and clinical overview. *Diabetes Metab. Rev.* **5**, 299-319.

Randle PJ. (1995) Metabolic fuel selection: General integration at the whole-body level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 317-327.

Regulação hormonal do metabolismo energético

Attie AD & Raines RT. (1995) Analysis of receptor-ligand interactions. *J. Chem. Ed.* **72**, 119-123.

Elia M. (1995) General integration and regulation of metabolism at the organ level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 213-234.

Harris RA & Crabb DW. (1997) Metabolic interrelationships. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 4th edn (Devlin TM, ed), pp. 525-562, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Uma descrição das inter-relações metabólicas entre os tecidos humanos durante o metabolismo normal e o efeito em tecidos específicos do metabolismo energético do estresse do exercício, da lactação, do diabetes e da doença renal.

Holloszy JO & Kohrt WM. (1996) Regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 121-138.

Pilkis SJ & Claus TH. (1991) Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* **11**, 465-515.

Uma revisão em nível avançado.

Snyder SH. (1985) The molecular basis of communication between cells. *Sci. Am.* **253** (October), 132-141.

Uma discussão em nível introdutório do sistema endócrino humano.

Zammit VA. (1996) Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem. J.* **314**, 1-14.

Estrutura e função dos hormônios

Litwack G & Schmidt RJ. (1997) Biochemistry of hormones I: polypeptide hormones. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 4th edn (Devlin TM, ed.), pp. 839-891. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Litwack G & Schmidt RJ. (1997) Biochemistry of hormones II: steroid hormones. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 4th edn (Devlin TM, ed.), pp. 893-918. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Leptina e o controle da massa corporal

Auwerx J & Staels B. (1998) Leptin. *Lancet* **351**, 737-742.

Breve revisão do sistema da leptina e transdução do sinal pela JAK-STAT.

Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, & Flier JS. (1998) Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat. Neurosci.* **1**, 445-450.

Revisão curta e excelente.

Flier JS & Maratos-Flier E. (1998) Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* **92**, 437-440.

Freake HC. (1998) Uncoupling proteins: beyond brown adipose tissue. *Nutr. Rev.* **56**, 185-189.

Revisão da estrutura, função e papel das proteínas desacopladoras.

Friedman JM & Halaas JL. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770.

Inui A. (1999) Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides — mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci.* **22**, 62-67.

Revisão curta, de nível intermediário, sobre o sistema da leptina.

Jequier E & Tappy L. (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* **79**, 451-480.

Revisão detalhada do papel da leptina na regulação do peso corporal, no controle da ingestão de alimentos e do papel do tecido adiposo marrom e branco no gasto de energia.

Wood SC, Seeley RJ, Porte D Jr, & Schwartz MW. (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* **280**, 1378-1383.

Revisão do papel da leptina, insulina e outros neuropeptídeos na regulação da alimentação e do catabolismo.

Problemas

1. O ATP e a fosfocreatina como fontes de energia para o músculo. No músculo esquelético em contração, a concentração da fosfocreatina cai enquanto a concentração do ATP permanece bem constante. Explique como isso acontece. Em um experimento clássico, Robert Davies descobriu que, se o músculo for tratado com 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (veja pág. 109), a concentração do ATP no músculo declina rapidamente, enquanto a concentração da fosfocreatina permanece inalterada durante uma série de contrações. Sugira uma explicação.

2. O metabolismo do glutamato no cérebro. O glutamato do sangue que flui pelo cérebro é transformado em glutamina, que aparece no sangue que sai do cérebro. O que se consegue com essa conversão metabólica? Como ela se realiza? Na realidade, o cérebro pode gerar mais glutamina do que aquela sintetizada a partir do glutamato que entra no sangue. Como surge essa glutamina extra? (Indicação: você talvez queira rever o catabolismo de aminoácidos no Capítulo 18; lembre-se de que o NH_3 é muito tóxico para o cérebro.)

3. Ausência da glicerol quinase no tecido adiposo. O glicerol-3-fosfato é um intermediário-chave na biossíntese dos triacilgliceróis. Os adipócitos, que são especializados na síntese e degradação dos triacilgliceróis, não conseguem usar glicerol, porque eles não possuem a glicerol quinase, que catalisa a reação

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glicerol-3-fosfato} + \text{ADP}$$

Como o tecido adiposo obtém o glicerol-3-fosfato necessário para a síntese do triacilglicerol? Explique.

4. Consumo de oxigênio durante o exercício. Um adulto sedentário consome cerca de 0,05 litro de O_2 durante um período de 10s. Um velocista, em uma corrida de 100m, consome cerca de 1 litro de O_2 durante o mesmo período. Após o término da corrida, o velocista continuará a respirar com uma elevada, embora declinante, taxa por alguns minutos, consumindo 4 litros extras de O_2 sobre a quantidade consumida pelo indivíduo sedentário.

(a) Por que a necessidade de O_2 aumenta dramaticamente durante a corrida?

(b) Por que a demanda de O_2 permanece alta depois que a corrida terminou?

5. A deficiência de tiamina e a função cerebral. Indivíduos com deficiência em tiamina apresentam vários sinais neurológicos característicos: perda dos reflexos, ansiedade e confusão mental. Sugira uma razão por que a deficiência em tiamina se manifesta por alterações na função cerebral.

6. Significado da concentração hormonal. Em condições normais, a medula da supra-renal humana secreta adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$) em uma velocidade suficiente para manter a concentração de 10^{-10}M no sangue circulante. Para apreciar o que essa concentração significa, calcule o diâmetro de uma piscina redonda com profundidade de 2m, que seria necessária para dissolver 1g (uma colher das de chá) de adrenalina, em uma concentração igual àquela do sangue.

7. Regulação dos níveis hormonais no sangue. A vida média da maioria dos hormônios no sangue é relativamente curta. Por exemplo, se a insulina radioativamente marcada for injetada em um animal, podemos determinar que dentro de 30min metade do hormônio terá desaparecido do sangue.

(a) Qual é a importância da inativação relativamente rápida dos hormônios circulantes?

(b) Tendo em vista essa rápida inativação, como o nível hormonal circulante pode ser mantido constante em condições normais?

(c) De que maneira o organismo pode tornar possível alterações rápidas no nível dos hormônios circulantes?

8. Hormônios hidro *versus* lipossolúveis. Com base nas suas propriedades físicas, os hormônios caem em uma de duas categorias: aqueles que são muito solúveis em água mas relativamente insolúveis em lipídios (ou seja, a adrenalina) e aqueles que são relativamente insolúveis em água mas altamente solúveis nos lipídios (ou seja, os hormônios esteróides). No seu papel de reguladores da atividade celular, a maioria dos hormônios hidrossolúveis não penetra no interior das suas células-alvo. Os hormônios lipossolúveis, ao contrário, penetram nas suas células-alvo e no final atuam no núcleo. Qual é a correlação entre solubilidade, a localização de receptores e o modo de ação dessas duas classes de hormônios?

9. Diferenças metabólicas no músculo e fígado na situação de "lutar ou fugir". Durante a situação de "lutar ou fugir", a liberação da adrenalina promove a degradação do glicogênio no fígado, coração e músculo esquelético. O produto final da degradação do glicogênio no fígado é a glicose. Ao contrário, o produto final no músculo esquelético é o piruvato.

(a) Por que são observados produtos diferentes da degradação do glicogênio nesses dois tecidos?

(b) Qual é a vantagem do organismo, durante a condição de "lutar ou fugir", ter essas vias específicas de degradação do glicogênio?

10. Quantidade excessiva de secreção de insulina: hiperinsulinismo. Certos tumores malignos do pâncreas induzem uma produção excessiva da insulina pelas células β. Indivíduos afetados exibem calafrio e tremores, fraqueza e fadiga, sudorese e fome.

(a) Qual é o efeito do hiperinsulinismo no metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e lipídios no fígado?

(b) Quais são as causas dos sintomas observados? Sugira por que esta condição, se prolongada, leva à lesão cerebral.

11. **Termogênese induzida pelos hormônios tireóideos.** Os hormônios tireóideos estão intimamente envolvidos na regulação da taxa metabólica basal. O tecido hepático dos animais que recebem tiroxina em excesso apresenta um aumento da taxa de consumo de O_2 e um aumento da produção de calor (termogênese); entretanto, a concentração de ATP no tecido é normal. Diferentes explicações têm sido oferecidas para o efeito termogênico da tiroxina. Uma é que o excesso do hormônio tireóideo induza o desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Como tal efeito explicaria as observações? Uma outra explicação sugere que a termogênese seja provocada por uma taxa aumentada da utilização de ATP pelo tecido estimulado pela tireóide. É essa uma explicação razoável? Por quê?

12. **A função dos pró-hormônios.** Quais são as possíveis vantagens na síntese dos hormônios como pró-hormônios ou pré-pró-hormônios.

13. **Fontes de glicose no corpo humano.** O adulto humano típico utiliza cerca de 160g de glicose por dia, sendo 120g utilizados pelo cérebro. A reserva disponível de glicose é suficiente para um dia (cerca de 20g de glicose circulante e 190g de glicogênio). Quando as reservas são depletadas, como poderia um organismo em jejum obter mais glicose?

14. **Camundongo parabiótico *ob/ob*.** Por meio de cirurgia cuidadosa, é possível conectar os sistemas circulatórios de dois camundongos, de tal forma que o mesmo sangue circule nos dois animais. Nesses camundongos **parabióticos**, os produtos liberados no sangue de um animal alcança o outro animal através da mesma circulação. Os dois animais são livres para comer independentemente. Quando um camundongo *ob/ob* (ambas as cópias do gene *OB* são defeituosas) e um camundongo normal *OB/OB* (duas cópias boas do gene OB) tornam-se parabióticos, o que acontece com o peso de cada camundongo?

CAPÍTULO 24

Genes e Cromossomos

Cada célula de um organismo multicelular geralmente contém o mesmo complemento de material genético. Basta olhar um ser humano para se ter uma pista da riqueza de informação contida em cada célula humana. As moléculas de DNA são as maiores macromoléculas nas células e são usualmente empacotadas em estruturas chamadas de **cromossomos**. A maioria das bactérias e dos vírus possuem um único cromossomo, enquanto as células eucarióticas usualmente possuem muitos. Um único cromossomo pode carregar milhares de genes. Juntos, todos os genes e DNA intergênicos (DNA entre os genes) da célula formam o **genoma** celular.

Medidas realizadas na década de 1950 sugeriram que os maiores DNAs possuíam um peso molecular de 10^6 ou menos, equivalente a cerca de 15.000 pares de bases. Métodos aperfeiçoados para o isolamento de DNAs nativos revelaram que esses achados iniciais eram enganosamente baixos. Por exemplo, os 16 cromossomos, no genoma relativamente pequeno da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, possuem massas moleculares que oscilam entre $1{,}5 \times 10^8$ a 1×10^9 dáltons, correspondendo a moléculas de DNA com 230.000 a 1.532.000 pares de bases contíguas. Hoje, sabemos que essas grandes moléculas nativas de DNA são facilmente quebráveis por forças mecânicas de cisalhamento, tornando o isolamento de moléculas intactas algo delicado.

O próprio tamanho das moléculas de DNA representa em si mesmo um problema biológico interessante. Os DNAs cromossômicos têm freqüentemente muitas ordens de grandeza maiores que as células ou os vírus que os contêm (Fig. 24-1; Tabela 24-1). Neste capítulo, portanto, moveremo-nos da estrutura secundária do DNA (considerada no Capítulo 10) ao extraordinário grau de organização requerido para o empacotamento terciário do DNA nos cromossomos. Primeiro, examinaremos os elementos dentro dos cromossomos virais e celulares, então estimaremos seu tamanho e organização. Em seguida, consideraremos a topologia do DNA, oferecendo uma descrição do enovelamento das moléculas do DNA. Finalmente, discutiremos as interações proteína-DNA, que organizam os cromossomos em estruturas compactas.

Tabela 24-1 – Os tamanhos do DNA e das partículas virais de alguns vírus bacterianos (bacteriófagos)

Vírus	Número de pares de bases no DNA viral*	Comprimento do DNA viral (nm)	Maior dimensão da partícula viral (nm)
ϕX174	5.386†	1.939†	25
T7	39.936	14.377	78
λ (lambda)	48.502	17.460	190
T4	168.889	60.800	210

*As seqüências completas das bases dos genomas destes bacteriófagos foram determinadas.

†Os dados são para a forma replicativa (fita dupla).

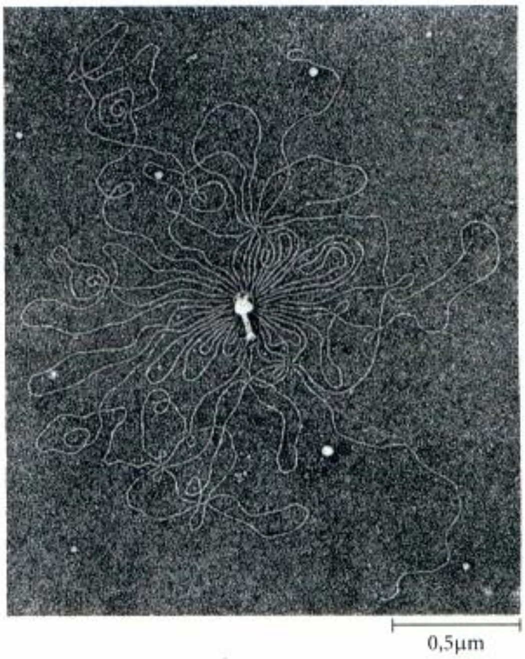


Figura 24-1 – A proteína da capa do bacteriófago T2 cercada por sua molécula de DNA linear e única. O DNA foi liberado pela lise da partícula do bacteriófago em água destilada, permitindo que o DNA se espalhasse na superfície da água. Uma partícula de bacteriófago T2 não lesada consiste de uma estrutura de cabeça, que se estreita em uma cauda pela qual o bacteriófago se liga à superfície externa de uma célula bacteriana. Todo o DNA mostrado nessa eletromicrografia está normalmente empacotado dentro da cabeça do fago.

Elementos Cromossômicos

O DNA celular contém tanto genes como regiões intergênicas, ambas podendo apresentar funções vitais para a célula. Genomas mais complexos, como os das células eucarióticas, exigem níveis maiores de organização cromossômica, e isso se reflete nas características estruturais do cromossomo. Começaremos considerando os diferentes tipos de seqüências de DNA e os elementos estruturais dentro do cromossomo.

Genes são segmentos de DNA que codificam cadeias polipeptídicas e RNAs

Nossa atual compreensão dos genes evoluiu consideravelmente no século XX. Classicamente, um gene é definido como uma porção do cromossomo que determina ou afeta um único caráter ou **fenótipo** (propriedade visível), como a cor dos olhos. Uma definição molecular foi proposta por George Beadle e Edward Tatum, em 1940. Depois de exporem esporos do fungo *Neurospora crassa* aos raios X e a outros agentes sabidamente capazes de lesar o DNA e provocarem alterações na seqüência do DNA (**mutações**), eles

George W. Beadle
(1903-1989)

Edward L. Tatum
(1909-1975)

detectaram cepas mutantes do fungo que não tinham uma ou outra enzima específica, às vezes, resultando na falta de uma via metabólica inteira. Beadle e Tatum concluíram que um gene é um segmento do material genético que determina ou codifica uma enzima: a hipótese de **um gene–uma enzima**. Mais tarde, esse conceito foi ampliado para **um gene–uma proteína**, porque muitos genes codificam proteínas que não são enzimas.

A moderna definição bioquímica de um gene é um pouco mais precisa. Lembre-se de que muitas proteínas apresentam cadeias polipeptídicas múltiplas (Capítulo 5). Em algumas proteínas, todos os polipeptídeos são idênticos e codificados pelo mesmo gene. Outras proteínas apresentam duas ou mais espécies de cadeias polipeptídicas diferentes, cada uma com uma seqüência de aminoácidos distinta. A hemoglobina A, a principal hemoglobina humana do adulto, por exemplo, apresenta duas espécies de cadeias polipeptídicas, as cadeias α e β, que diferem na seqüência de aminoácidos e são codificadas por dois genes diferentes. Dessa forma, a relação gene-proteína é mais precisamente descrita pela frase "um gene–um polipeptídeo".

Mesmo essa definição não é suficientemente precisa, porque nem todos os genes são expressos na forma de cadeias polipeptídicas. Alguns, por exemplo, codificam os tRNAs e rRNAs (Capítulos 10 e 26), e uma definição completa precisa incluir esses genes. Um gene, portanto, é todo o DNA que codifica uma seqüência primária de algum produto gênico final, como um polipeptídeo ou um RNA com uma função catalítica ou estrutural. O DNA contém outros segmentos ou seqüências que apresentam uma função puramente regulatória. **Seqüências regulatórias** fornecem sinais que podem denotar o início ou o fim dos genes, influenciar a transcrição de genes ou funcionar como pontos de iniciação para a replicação ou recombinação (Capítulo 28).

O tamanho mínimo completo dos genes que codificam proteínas pode ser estimado diretamente. Como descreveremos em detalhes no Capítulo 27, cada aminoácido de uma cadeia polipeptídica é codificado por uma seqüência de três nucleotídeos consecutivos, em uma fita única de DNA (Fig. 24-2), com essas "trincas" codificadoras arranjadas em uma seqüência que corresponde à seqüência de aminoácidos no polipeptídeo que o gene codifica. Uma única cadeia polipeptídica pode ter cerca de 50 até vários milhares de resíduos de aminoácidos; o gene que codifica essa cadeia polipeptídica deve ter, pelo menos, três vezes mais pares de bases. Uma cadeia polipeptídica média de 350 resíduos de aminoácidos corresponderia a 1.050 pares de bases. Muitos genes, nos eucariotos, e alguns poucos, nos procariotos, são interrompidos por segmentos de DNA não-codificadores e são, portanto, consideravelmente maiores do que sugeriria o cálculo simples esquematizado acima.

Quantos genes há em um único cromossomo? O cromossomo da *Escherichia coli*, um dos genomas procarióticos que foi seqüenciado completamente, é uma molécula de DNA circular (no sentido de uma alça sem fim em vez de um círculo perfeito) com 4.638.858 pares de bases. Estes pares de bases codificam cerca de 4.300 genes para proteínas e outros 115 genes para moléculas de RNA estáveis. Entre os eucariotos, onde nossa informação ainda não é tão completa, os 3 bilhões de pares de bases do genoma humano codificam de 50 a 100 milhares de genes em 24 cromossomos diferentes.

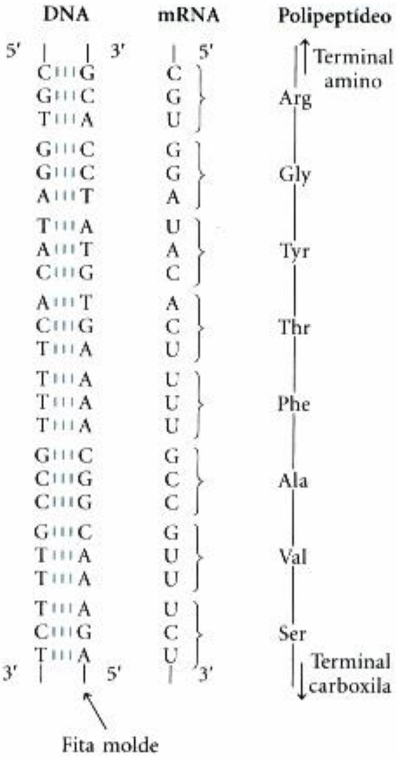


Figura 24-2 – Colinearidade das seqüências nucleotídicas codificadoras do DNA e do mRNA e a seqüência de aminoácidos da cadeia polipeptídica. As trincas das unidades nucleotídicas no DNA determinam a seqüência de aminoácidos nas proteínas, por meio do intermediário mRNA. Uma das fitas do DNA funciona como um molde para a síntese do mRNA, que possui trincas nucleotídicas (códons) complementares àquelas do DNA. Em alguns genes bacterianos e muitos eucarióticos, as seqüências codificadoras são interrompidas por regiões de seqüências não-codificadoras (chamadas de íntrons).

Os cromossomos eucarióticos são muito complexos

As bactérias possuem, normalmente, apenas um cromossomo por célula e, em aproximadamente todos os casos, cada cromossomo contém apenas uma cópia de cada gene. Alguns poucos genes, como aqueles dos rRNAs, são repetidos várias vezes. Seqüências de genes reguladores e estruturais são responsáveis por grande parte do DNA nos procariotos. Além disso, quase todo gene é precisamente colinear com a seqüência de aminoácidos (ou seqüência de RNA) que codifica (Fig. 24-2).

A organização dos genes no DNA eucariótico é estrutural e funcionalmente muito mais complexa, e o estudo da estrutura do cromossomo eucariótico tem produzido muitas surpresas. Testes realizados sobre a quantificação de segmentos de DNA de camundongo que ocorrem em cópias múltiplas tiveram um resultado não esperado. Cerca de 10% do DNA do camundongo consiste de pequenas extensões de menos que 10 pares de bases que são repetidas milhões de vezes na célula. Estas são chamadas de seqüências **altamente repetitivas**, ou **seqüência de DNA simples**. Outros 20% do DNA do camundongo ocorrem em segmentos de até algumas poucas centenas de pares de bases e são repetidos pelo menos 1.000 vezes, esse DNA é designado **mode-**

radamente repetitivo. Parte do DNA repetitivo pode, simplesmente, ser "DNA lixo", vestígios de trilhas evolucionárias deixadas de lado. Entretanto, como veremos, pelo menos, parte dele possui um significado funcional. Os 70% remanescentes do DNA de camundongo consistem de segmentos que são únicos ou repetidos apenas algumas vezes. As seqüências únicas nos cromossomos eucarióticos incluem a maioria dos genes.

A seqüência de DNA simples também tem sido chamada de **DNA satélite**, assim denominada porque sua composição de bases não usuais freqüentemente força-o a migrar como bandas "satélites" (separadas do resto do DNA), quando amostras fragmentadas de DNA celular são centrifugadas em gradientes de densidade de cloreto de césio. Estudos sugerem que o DNA de seqüência simples não codifica proteínas ou RNAs. Muito dele está associado a duas importantes estruturas nos cromossomos eucarióticos: centrômeros e telômeros.

Uma característica definidora de um cromossomo eucariótico é o seu **centrômero** (Fig. 24-3), uma seqüência de DNA que funciona durante a divisão celular como um ponto de ligação para proteínas que unem o cromossomo ao fuso mitótico. Essa ligação é essencial na segregação dos cromossomos para as células filhas. Os centrômeros dos cromossomos da levedura foram isolados e estudados. As seqüências essenciais à função do centrômero têm cerca de 130 pares de bases e são muito ricas em pares A═T. As seqüências centroméricas dos eucariotos superiores são muito maiores e (ao contrário das de levedura) geralmente contêm DNA de seqüência simples. Ele consiste de milhares de cópias repetidas de uma ou muito poucas seqüências curtas de 5 a 10 pares de bases, na mesma orientação. O papel exato do DNA satélite na função do centrômero não é ainda conhecido.

Telômeros são seqüências localizadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, que ajudam a estabilizá-los. Os telômeros mais bem caracterizados são aqueles dos eucariotos mais simples. Os telômeros da levedura terminam com cerca de 100 pares de bases de seqüências imprecisamente repetidas na forma:

$$(5')\ (T_xG_y)_n$$
$$(3')\ (A_xC_y)_n$$

onde x e y geralmente caem no intervalo de 1 a 4. O número de repetições do telômero, n, está entre 20 e 100 para os cromossomos da maioria dos eucariotos unicelulares e, geralmente, acima de 1.500 nos mamíferos. As extremidades de uma molécula de DNA linear não conseguem ser replicadas pela maquinaria da replicação celular (o que pode ser uma das razões por que as moléculas de DNA bacteriano são circulares). As seqüências repetitivas dos telômeros são adicionadas às extremidades dos cromossomos eucarióticos principalmente pela enzima telomerase, que será discutida no Capítulo 26. O mecanismo que controla o número das repetições em um telômero não é conhecido.

Cromossomos artificiais foram construídos como um meio para melhor entender o significado funcional de muitas características estruturais dos cromossomos eucarióticos. Um cromossomo linear artificial, razoavelmente estável, requer apenas três componentes: um centrômero, telômeros e seqüências que permitem a iniciação da replicação do DNA. Cromossomos artificiais de levedura (YACs) foram desenvolvidos como uma ferramenta na biotecnologia. Segmentos muito grandes de DNA estranho (que não a levedura) podem ser incluídos em YACs e então se propagar nas células de levedura para uso na pesquisa e na biotecnologia. Semelhantemente, cromossomos artificiais humanos (HACs) estão sendo desenvolvidos para o tratamento de doenças genéticas pela terapia gênica somática (Capítulo 29).

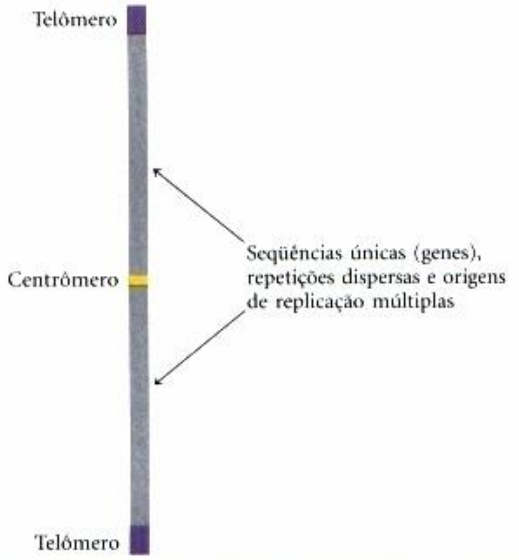

Telômero
Centrômero
Seqüências únicas (genes), repetições dispersas e origens de replicação múltiplas
Telômero

Figura 24-3 – Elementos estruturais importantes de um cromossomo de levedura.

A maioria do DNA moderadamente repetitivo consiste de repetições de 150 a 300 pares de bases espalhadas pelo genoma dos eucariotos superiores; algumas dessas repetições foram caracterizadas. Um certo número delas é relacionado (ou pode ser) aos elementos transponíveis, seqüências que se movem no genoma em uma freqüência muito baixa (Capítulo 25). No homem, uma classe dessas repetições (de cerca de 300 pares de bases de comprimento) é chamada de família *Alu*, assim chamada porque sua seqüência geralmente inclui uma cópia da seqüência de reconhecimento para a endonuclease de restrição *Alu*I. (Endonucleases de restrição serão descritas no Capítulo 29.) Centenas de milhares de repetições *Alu* estão dispersas no genoma humano, perfazendo de 1 a 3% do DNA total. *Alu* e repetições semelhantes dispersas perfazem cerca de 5 a 10% do DNA humano. Não se conhece nenhuma função para esse DNA.

Muitos genes eucarióticos contêm seqüências intercaladas não-traduzíveis (íntrons)

Muitos, senão a maioria, dos genes eucarióticos apresentam uma característica estrutural distinta e enigmática: suas seqüências de nucleotídeos contêm um ou mais segmentos de DNA que não codificam a seqüência de aminoácidos do produto polipeptídico. Esses insertos não-traduzíveis interrompem a relação até então precisamente colinear entre a seqüência de nucleotídeos do gene e a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo que ele codifica. Tais segmentos de DNA não-traduzíveis são chamados de **seqüências intercaladas**, ou **íntrons**, e os segmentos codificadores, de **éxons**. Poucos genes procarióticos contêm íntrons.

Nos genes eucarióticos examinados até agora, os pesquisadores têm encontrado muita variedade no número e posição dos íntrons e na fração do gene total que ele ocupa. Por exemplo, o gene que codifica a cadeia polipeptídica simples da proteína do ovo de galinha, a ovoalbumina (Fig. 24-4), os íntrons são muito maiores do que os éxons; juntos, sete íntrons perfazem 85% do DNA do gene. No gene da subunidade β da hemoglobina, um único íntron contém mais da metade do DNA do gene. O gene para a proteína conalbumina do ovo da galinha contém 17 íntrons, e descobriu-se que um gene do colágeno tem mais de 50 íntrons. Os genes para as histonas parecem não ter íntrons. Apenas alguns poucos genes procarióticos contêm íntrons. Na maioria dos casos, a função dos íntrons não é clara.

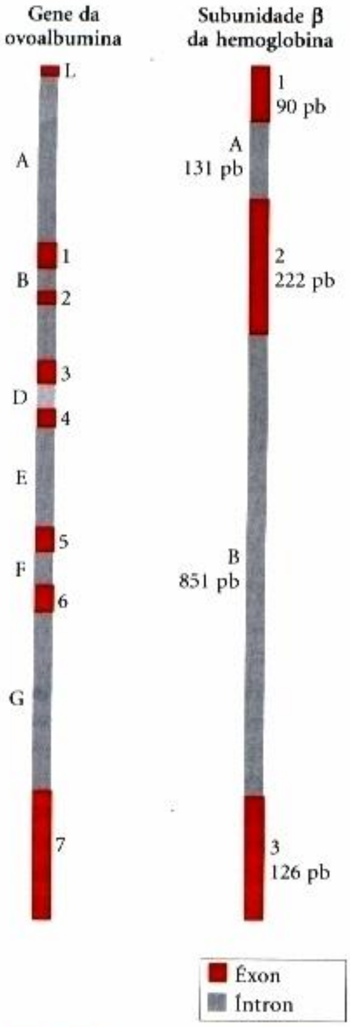
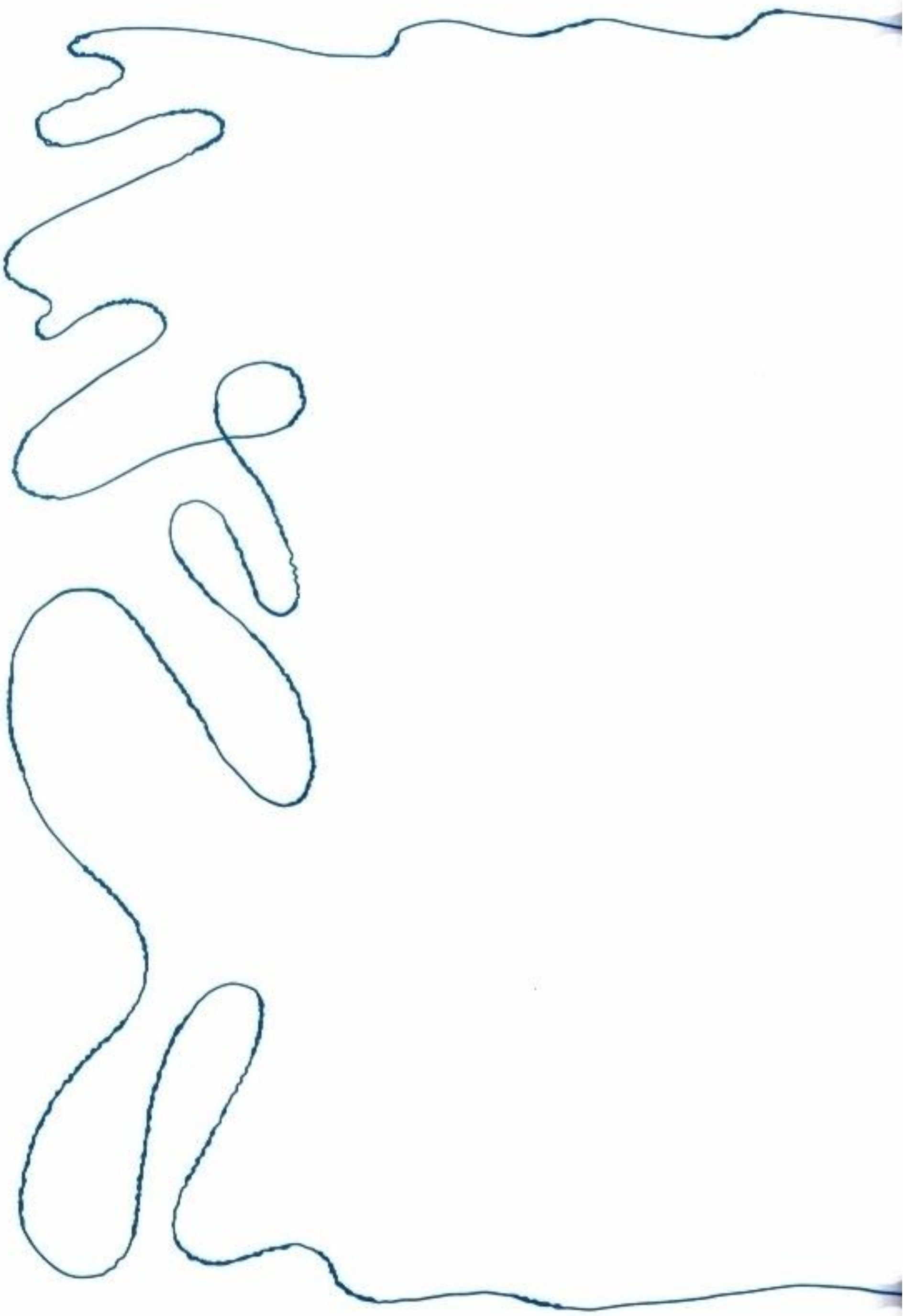


Figura 24-4 – Seqüências intercaladas, ou íntrons, em dois genes eucarióticos. O gene para a ovoalbumina possui sete íntrons (A a G), dividindo a seqüência codificadora em oito éxons (L, 1 a 7). O gene para a subunidade β da hemoglobina possui dois íntrons e três éxons, incluindo um íntron que sozinho contém mais da metade dos pares de bases (bp) do gene.



O Tamanho e a Seqüência Estrutural das Moléculas do DNA

O empacotamento e a segregação dos cromossomos, nas células filhas, durante a divisão celular, são críticos para a vida da célula. Seqüências de DNA e proteínas específicas estão implicadas nesses eventos. Em nosso exame da organização e estrutura dos cromossomos, consideraremos agora como o DNA é organizado para se acomodar nas células procarióticas e eucarióticas.

As moléculas do DNA viral são relativamente pequenas

Os vírus geralmente contêm informação genética consideravelmente menor que as células, porque eles usam os recursos da célula hospedeira para muitos dos processos requeridos para se propagar. Uma partícula de vírus infeccioso freqüentemente consiste de não mais do que o seu genoma (usualmente uma molécula única de RNA ou DNA) envolta por uma capa de proteína.

Quase todos os vírus de plantas e alguns vírus bacterianos e animais contêm RNA. Esses genomas tendem a ser particularmente pequenos. Por exemplo, os genomas dos retrovírus de mamíferos, como o HIV, possuem cerca de 9.000 nucleotídeos de tamanho, e o do bacteriófago Qβ 4.220 nucleotídeos. Ambos os tipos de vírus possuem genomas de fita simples de RNA.

O genoma dos vírus de DNA varia intensamente em tamanho (Tabela 24-1). A partir do peso molecular de uma fita dupla (dúplex) de DNA viral, é possível calcular a sua **extensão de contorno** (a extensão de sua hélice), sabendo-se que cada par de nucleotídeos possui um peso molecular médio de cerca de 650 e um comprimento do dúplex de 3,4Å (veja Fig. 10-15). (Observe, entretanto, que o DNA de alguns vírus é de fita simples em vez de fita dupla.)

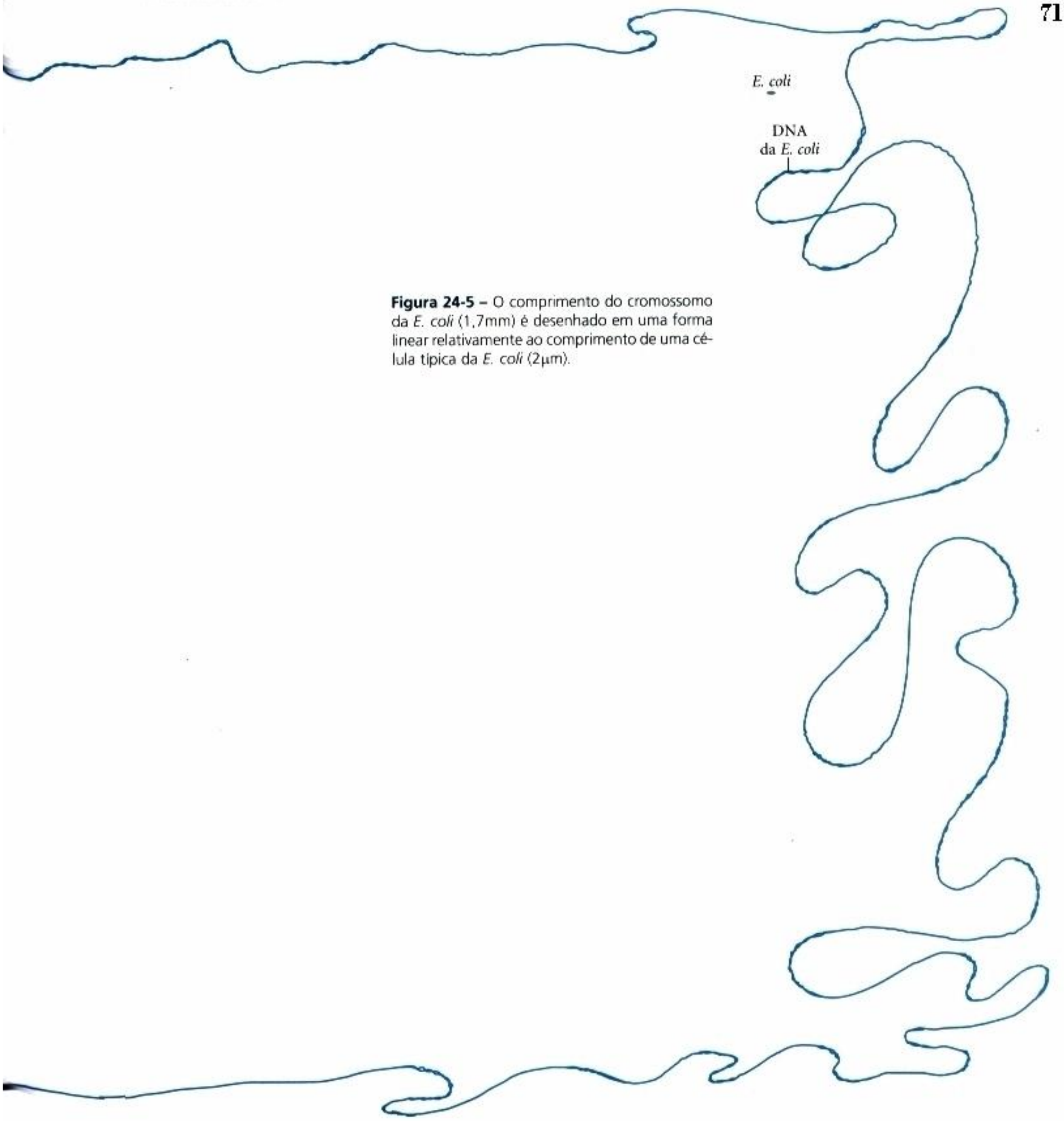


Figura 24-5 – O comprimento do cromossomo da *E. coli* (1,7mm) é desenhado em uma forma linear relativamente ao comprimento de uma célula típica da *E. coli* (2μm).

Muitos DNAs virais são circulares durante, pelo menos, parte do seu ciclo de vida. Durante a replicação viral, dentro de uma célula hospedeira, tipos específicos de DNAs virais, chamados de **formas replicativas**, podem aparecer; por exemplo, muitos DNAs lineares se tornam circulares e todos os DNAs de fita única se tornam fita dupla.

Um DNA viral de tamanho médio típico é o bacteriófago λ (lambda), que infecta a *E. coli*. Na sua forma replicativa dentro das células, o seu DNA é uma dupla hélice circular. Esse DNA de fita dupla contém 48.502 pares de bases e possui uma extensão de contorno de 17,5μm. O bacteriófago ϕX174 é um vírus de DNA muito menor; o DNA em uma partícula viral do ϕX174 é um círculo de fita simples, e sua forma replicativa contém 5.386 pares de bases. As extensões de contorno dos vírus de DNA, como notado anteriormente, são muito maiores que a maior dimensão da partícula viral que os contém. O DNA do bacteriófago T4, por exemplo, é cerca de 290 vezes maior que a própria partícula viral (Tabela 24-1).

As bactérias contêm DNA cromossômico e extracromossômico

As bactérias contêm muito mais DNA do que os vírus de DNA. Uma única célula de *E. coli* contém quase 100 vezes mais DNA que uma partícula do bacteriófago λ. O cromossomo de uma célula de *E. coli* é uma molécula única de DNA circular de fita dupla. Seus 4.639.221 pares de bases possuem uma extensão de contorno de cerca de 1,7mm, quase 850 vezes o comprimento de uma célula da *E. coli* (Fig. 24-5). O DNA bacteriano tem de possuir uma estrutura terciária ainda mais compactada que a do DNA viral.

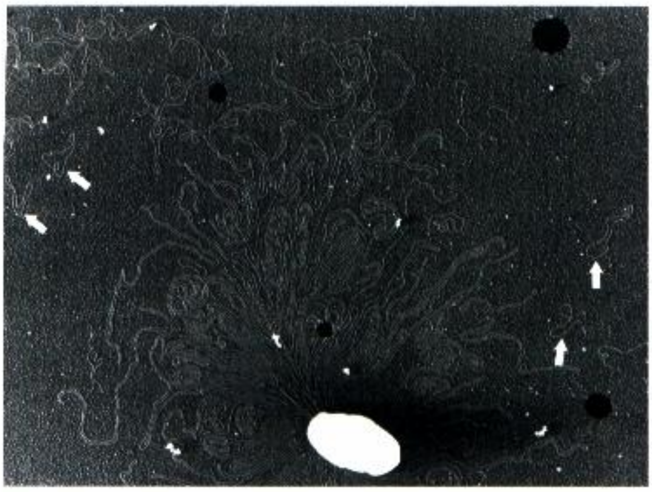


Figura 24-6 – DNA de um lisado da célula *E. coli*. Nesta eletromicrografia, vários DNAs plasmidiais, circulares e pequenos, estão indicados por setas brancas. As manchas pretas e os pontos brancos são artefatos da preparação.

Além do grande DNA cromossômico circular encontrado no nucleóide, muitas bactérias contêm uma ou mais moléculas de DNA circulares que estão livres no citoplasma. Esses elementos extracromossômicos são chamados de **plasmídios** (Fig. 24-6). Algumas classes de DNAs plasmidiais são, às vezes, temporariamente incorporadas no DNA cromossômico, para ser excisadas depois de uma maneira precisa por meio de um processo de recombinação especializado. A maioria dos plasmídios possui apenas poucos milhares de pares de bases, mas alguns contêm mais de 10^5 pares de bases. Os plasmídios transportam a informação genética e sofrem replicação para produzir os plasmídios filhos, que passam para as células filhas durante a divisão celular. Os plasmídios têm sido encontrados na levedura e em outros fungos, bem como em bactérias.

Em muitos casos, os plasmídios não conferem nenhuma vantagem óbvia ao seu hospedeiro e sua única função parece ser a autopropagação. Entretanto, alguns plasmídios transportam genes que tornam uma bactéria hospedeira resistente a agentes antibacterianos. Por exemplo, os plasmídios que transportam o gene para a enzima β-lactamase conferem resistência aos antibióticos β-lactâmicos, como a penicilina e a amoxicilina (veja Adendo 20-1). Esses e os plasmídios semelhantes podem passar de uma célula resistente ao antibiótico a uma célula sensível da mesma ou de outra espécie bacteriana, tornando a célula recipiente resistente ao antibiótico. O uso extensivo dos antibióticos, em algumas populações humanas, tem servido como uma forte força seletiva para o espalhamento dos transposons (Capítulo 25) e de plasmídios que codificam resistência a antibiótico em bactérias causadoras de doenças, criando cepas bacterianas resistentes a vários antibióticos. Os médicos estão se tornando relutantes na prescrição de antibióticos, a menos que uma necessidade clínica clara seja confirmada. Por razões semelhantes, o uso largamente difundido dos antibióticos na alimentação dos animais está sendo contido.

Os plasmídios são facilmente isolados intactos de células bacterianas e de levedura e são modelos úteis para o estudo de muitos processos no metabolismo do DNA. Eles também têm-se tornado um componente central das tecnologias modernas usadas para isolar, clonar e modificar genes artificialmente. Genes de uma variedade de espécies podem ser inseridos dentro de um plasmídio isolado. Um plasmídio, com um gene estranho, é reintroduzido em uma célula hospedeira normal, é replicado e transcrito e, no processo, pode induzir a célula hospedeira a fazer a proteína codificada pelo gene estranho, mesmo que ele não seja parte do genoma normal da célula. O Capítulo 29 descreve como tais **DNAs recombinantes** são construídos.

As células eucarióticas contêm mais DNA do que as procarióticas

Uma célula de levedura, um dos eucariotos mais simples, possui quatro vezes mais DNA do que uma célula da *E. coli*. Células da *Drosophila*, a mosca das frutas usada nos estudos clássicos da genética, possuem 25 vezes mais DNA do que as células da *E. coli*. Células humanas e de muitos outros mamíferos possuem cerca de 600 vezes mais DNA do que a *E. coli*. As células de muitas plantas e anfíbios possuem uma quantidade ainda maior. Embora as células eucarióticas contenham mais DNA do que as células bacterianas, um genoma eucariótico possui uma maior proporção de DNA, aparentemente não-codificador. Há cerca de aproximadamente 50 genes por milímetro de DNA humano, comparado com cerca de 2.500 genes por milímetro de DNA da *E. coli*. A maior parte desse DNA não-codificador pode desempenhar um papel importante na organização da estrutura do cromossomo eucariótico.

A extensão de contorno de todo o DNA existente em uma *única* célula humana é cerca de 2m, comparada a de 1,7mm para o DNA da *E. coli*. O corpo de um adulto humano contém, aproximadamente, 10^{14} células e, portanto, um DNA total de 2×10^{11}km. Compare isso com a circunferência da terra (4×10^4km) ou com a distância entre a Terra e o Sol ($1{,}5 \times 10^8$km), uma ilustração dramática do extraordinário grau de compactação do DNA nas nossas células.

A observação microscópica dos núcleos nas células eucarióticas em divisão tem mostrado que o material genético está subdividido nos cromossomos, sendo que seu número diplóide depende da espécie do organismo (Tabela 24-2). Uma célula somática humana, por exemplo, possui 46 cromossomos (Fig. 24-7). Cada cromossomo de uma célula eucariótica, como é mostrado na Figura 24-7a, contém uma única molécula de DNA dúplex muito longa, que pode ser de 4 a 100 vezes maior que a de uma célula de *E. coli*. Por exemplo, o DNA de um dos menores cromossomos humanos tem a extensão de contorno de cerca de 30mm, quase 15 vezes maior que o DNA de uma célula de *E. coli*. As moléculas de DNA, nos 24 tipos diferentes de cromossomos humanos (22 pares casados mais os cromossomos sexuais X e Y), variam em extensão em um intervalo de até 25 vezes. Cada tipo de cromossomo, nos eucariotos, transporta um conjunto de genes característicos.

Tabela 24-2 – Número normal de cromossomos em alguns organismos*

Bactéria	1	Abelha (fêmea)	32
Mosca da fruta	8	Raposa	34
Trevo vermelho	14	Gato	38
Ervilha do jardim	14	Camundongo	40
Levedura	16†	Rato	42
Milho (semente)	20	Coelho	44
Sapo	26	Homem	46
Hidra	30	Galinha	78

*Para todos os eucariotos listados, está indicado o número de cromossomos diplóides, exceto a levedura.

†Este é o número haplóide de cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Cepas de leveduras selvagem geralmente possuem oito (octaplóide) ou mais conjuntos destes cromossomos.

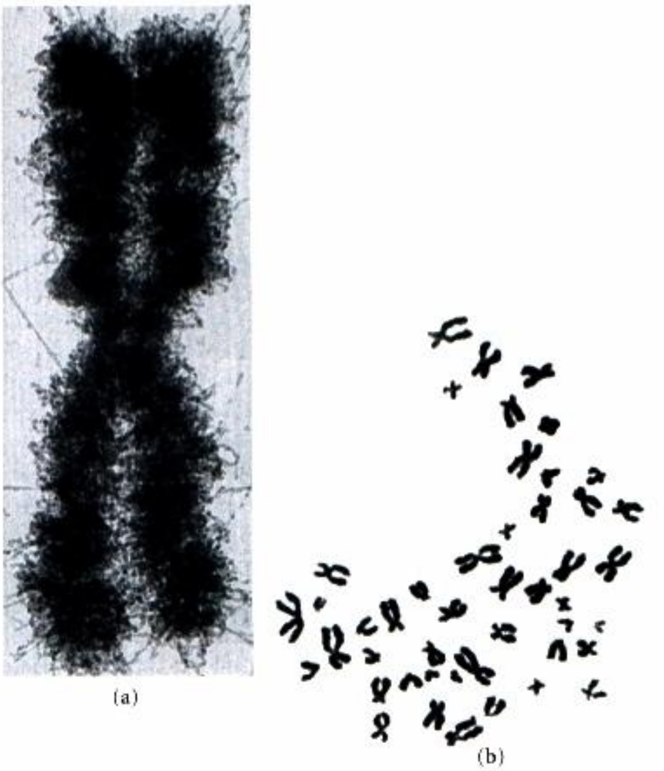


Figura 24-7 – Cromossomos eucarióticos. (**a**) Um cromossomo humano único. (**b**) Um conjunto completo de cromossomos de um leucócito obtido por um dos autores. Há 46 cromossomos em cada célula somática humana normal.

As organelas das células eucarióticas também contêm DNA

Nas células eucarióticas, um DNA que difere na seqüência de bases do DNA nuclear é encontrado nas mitocôndrias (Fig. 24-8) e nos cloroplastos. Menos de 0,1% de todo o DNA celular está presente nas mitocôndrias de uma célula somática típica, entretanto, nas células do ovo fertilizado e em divisão, em que as mitocôndrias são muito mais numerosas, a quantidade total do DNA mitocondrial é correspondentemente maior. As moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) são muito menores do que as dos cromossomos nucleares. Nas células animais, elas contêm menos que 20.000 pares de bases (16.569 pares de bases no mtDNA humano) e ocorrem como um dúplex circular. Os mtDNA das células de plantas oscilam entre o tamanho de 200.000 a 2.500.000 pares de bases. O DNA dos cloroplastos (cpDNA) também existe como dúplex circulares e oscilam entre 120.000 e 160.000 pares de bases.

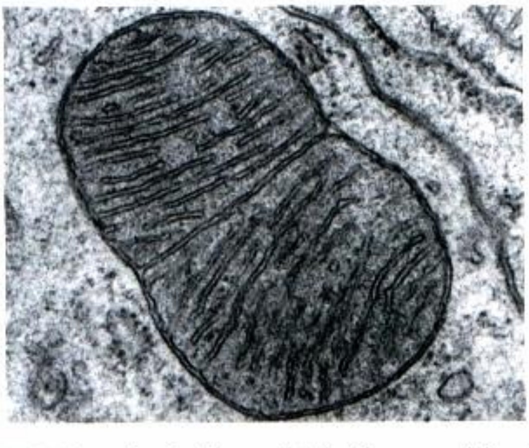


Figura 24-8 – Uma mitocôndria em divisão. Algumas proteínas e RNAs mitocondriais são codificados por uma das cópias do DNA mitocondrial (nenhuma delas visível aqui). O DNA (mtDNA) é replicado toda vez que a mitocôndria se dividir, antes da divisão celular.

A origem evolucionária dos DNAs mitocondrial e cloroplastial tem sido assunto de muita especulação. Um ponto de vista largamente aceito é que eles sejam vestígios dos cromossomos de antigas bactérias que ganharam acesso ao citoplasma das células hospedeiras e tornaram-se os precursores destas organelas (veja Fig. 2-15). O DNA mitocondrial codifica os tRNAs e rRNAs mitocondriais e umas poucas proteínas mitocondriais. Mais de 95% das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear. As mitocôndrias e os cloroplastos dividem-se quando a célula se divide. O seu DNA é replicado antes e durante a divisão, e as moléculas de DNA filhas passam para as organelas filhas.

Superespiralamento do DNA

O DNA celular, como vimos, está altamente compactado, implicando alto grau de organização estrutural. O mecanismo de enovelamento não apenas empacota o DNA, mas também permite o acesso da informação no DNA. Antes de considerarmos como isso é feito nos processos de replicação e transcrição, devemos examinar uma propriedade importante da estrutura do DNA, conhecida como **superespiralamento.**

Superespiralamento significa o espiralamento de uma espira. Um fio de telefone, por exemplo, é essencialmente espiralado. O caminho tomado pelo fio entre a base do fone até o aparelho geralmente descreve uma ou mais superespiras (Fig. 24-9). O DNA é espiralado na forma de uma dupla hélice, em que ambas as fitas da espira de DNA se enrolam em torno de um eixo. O espiralamento posterior desse eixo sobre si próprio (Fig. 24-10) produz o DNA superespiralado. Como detalhado a seguir, o DNA superespiralado é geralmente uma manifestação de uma tensão estrutural. Quando não houver uma curvatura do DNA sobre si próprio, o DNA está em estado de **relaxamento**.

Pode-se prever que a compactação do DNA envolva alguma forma de superespiralamento. Talvez, menos previsível seja o fato de que a replicação ou a transcrição do DNA também afete e seja afetada pelo superespiralamento. Ambos os processos requerem uma separação das fitas do DNA — que não é um processo simples em uma molécula com as duas fitas helicoidais entrelaçadas (Fig. 24-11).

Que o DNA se curve sobre si mesmo e se torne uma superespira em um DNA celular fortemente empacotado pareceria lógico e talvez mesmo trivial se não houvesse um fato adicional: muitas moléculas de DNA circular permanecem altamente superespiraladas mesmo depois que são liberadas das células e purificadas, livres das proteínas e de outros componentes celulares. Isso indica que o superespiralamento é uma propriedade intrínseca da estrutura terciária do DNA. Ela ocorre em todos os DNAs celulares e é altamente regulada por cada célula.

Um certo número de propriedades do superespiralamento foi estabelecido, o estudo dessas propriedades tem fornecido muitas idéias sobre a estrutura e a função do DNA. Este trabalho tem-se baseado especialmente em conceitos derivados de um ramo da matemática chamado de **topologia**, o estudo das propriedades de um objeto que não se modifica sob deformações contínuas. Para o DNA, a deformação contínua incluiria alterações conformacionais devidas à movimentação térmica ou a uma interação com proteínas ou com outras moléculas. Deformações descontínuas envolvem a quebra das fitas de DNA. Para as

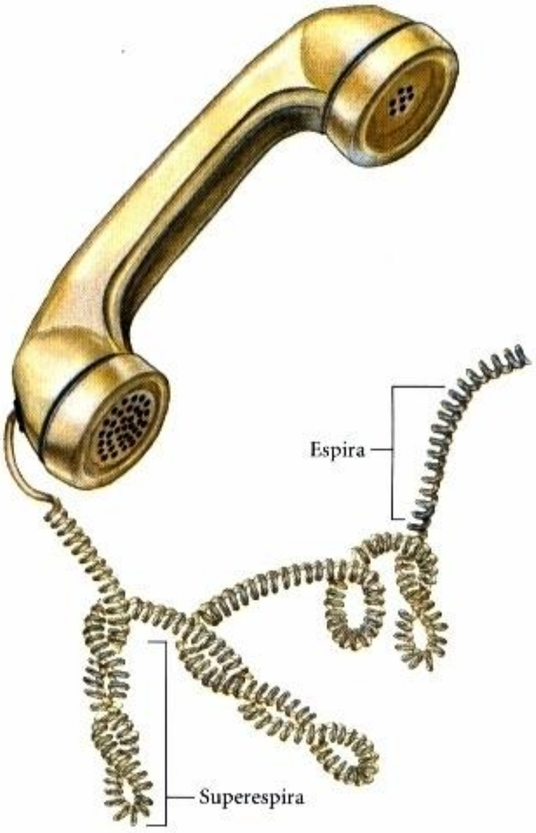


Figura 24-9 – Superespiras. Um fio de telefone típico é espiralado como uma hélice de DNA, e o fio espiralado pode, ele próprio, espiralar-se em uma superespira. A ilustração é especialmente apropriada, porque um exame do fio do telefone ajudou a levar Jerome Vinograd e seus colaboradores a discernirem que muitas propriedades dos DNAs circulares e pequenos poderiam ser explicadas pelo superespiralamento. Primeiro, eles detectaram o DNA superespiralado em DNAs virais circulares e pequenos, em 1965.

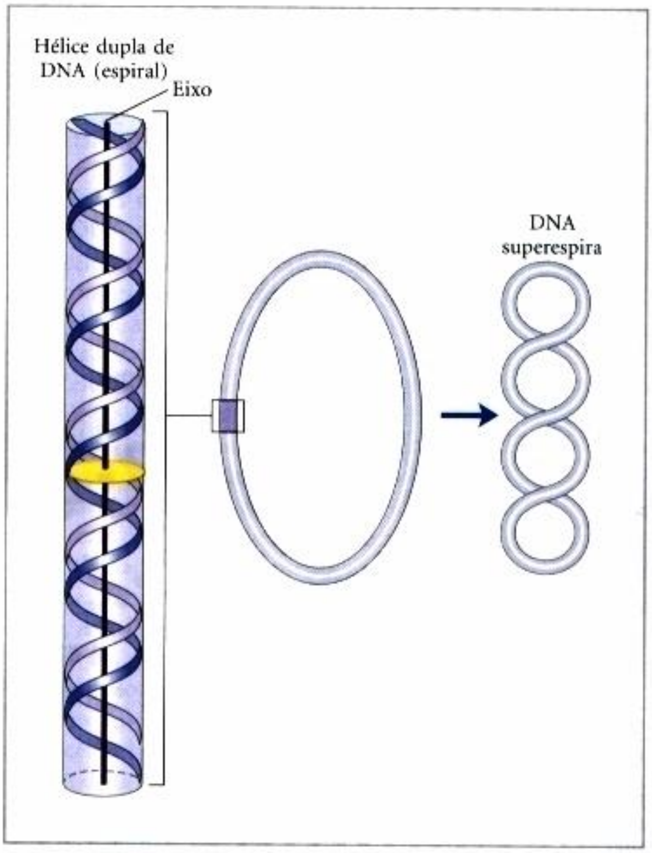


Figura 24-10 – Superespiralamento do DNA. Quando o eixo da dupla hélice de DNA é espiralado sobre si mesmo, ele forma uma nova hélice (super-hélice). O DNA super-hélice é usualmente chamado de superespira.

moléculas de DNA circulares, uma propriedade topológica é, portanto, aquela que não é afetada pelas deformações das fitas de DNA, desde que nenhuma quebra seja introduzida. Propriedades topológicas são alteradas apenas por quebra e reunião de uma ou de ambas as fitas do esqueleto de DNA.

Examinaremos a seguir as propriedades fundamentais e as bases físicas do superespiralamento.

A maior parte do DNA celular está subenrolada

Para entender o superespiralamento, precisamos primeiro focalizar as propriedades de DNAs pequenos e circulares, como os plasmídios e os pequenos DNA virais. Quando esses DNAs não contêm quebras em nenhuma fita, eles são chamados de **DNAs circulares fechados.** Se o DNA de uma molécula circular fechada obedecer aproximadamente à estrutura da forma B (a estrutura Watson-Crick; veja Fig. 10-15), com uma volta da dupla hélice para cada 10,5 pares de bases, ele se tornará relaxado em vez de superespiralado (Fig. 24-12). O superespiralamento ocorre quando o DNA estiver sujeito a alguma forma de tensão estrutural. O DNA circular fechado purificado raramente se apresentará relaxado, independentemente da sua origem biológica. Além disso, o DNA derivado de uma dada fonte celular apresenta um grau de superespiralamento característico. A estrutura do DNA está, portanto, tensionada de maneira tal que é regulada pela célula para induzir o superespiralamento.

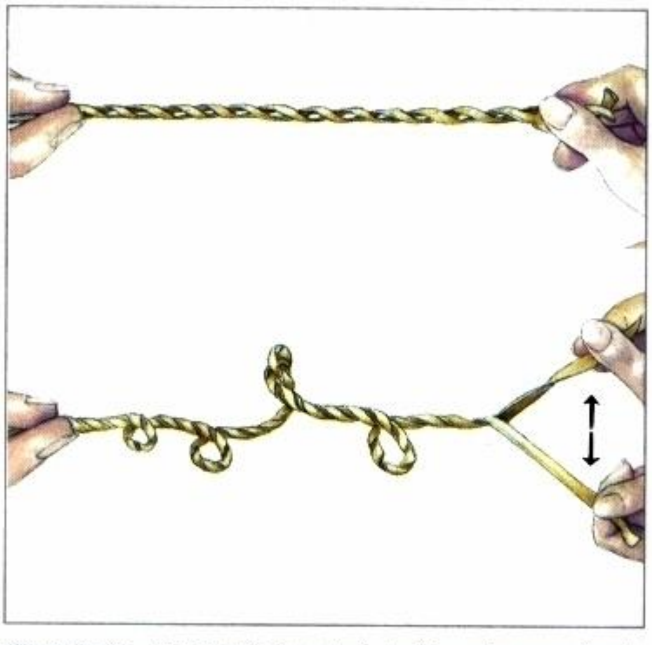


Figura 24-11 – Superespiralamento induzido pela separação das fitas de uma estrutura helicoidal. Enrole duas fitas lineares de borracha em uma dupla hélice no sentido da mão direita, como mostrado. Fixe uma extremidade, tendo um auxiliar que a segure, então puxe as duas fitas na outra extremidade. A fita resultante produzirá uma superespira.

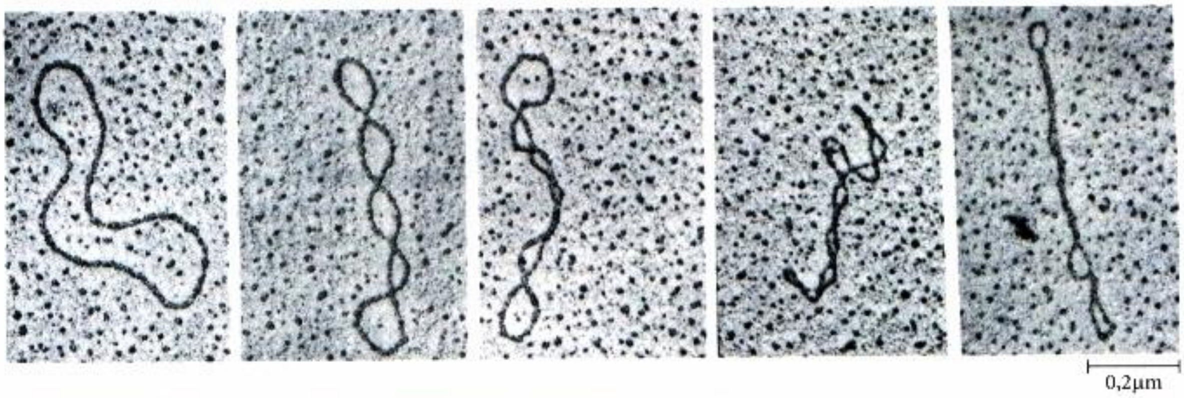


Figura 24-12 – DNAs plasmidiais superespiralados e relaxados. A molécula na eletromicrografia da extremidade esquerda apresenta-se relaxada; o grau de superespiralamento aumenta da esquerda para a direita.

Em quase qualquer instância, a tensão é o resultado de um subenrolamento da dupla hélice de DNA em um círculo fechado. Em outras palavras, há *menos* voltas na hélice do DNA do que seria esperado para a estrutura de forma B. Os efeitos do subenrolamento são ilustrados na Figura 24-13. Um segmento de 84 pares de bases de um DNA circular no estado relaxado conteria oito voltas da hélice dupla, ou uma para cada 10,5 pares de bases. Se uma dessas voltas fosse removida, haveria 84/7 ou cerca de 12 pares de bases por volta em vez dos 10,5 encontrados no DNA-B (Fig. 24-13b). Isso é um desvio da forma mais estável do DNA, e, como resultado, a molécula fica termodinamicamente mais tensa. Geralmente, a maior parte da tensão poderia ser acomodada pelo espiralamento do eixo do DNA sobre si mesmo, formando uma superespira (Fig. 24-13c; parte da tensão seria simplesmente tornada dispersa na estrutura não torcida de uma molécula de DNA maior). Em princípio, a tensão também poderia acomodar-se separando as duas fitas de DNA por uma distância de cerca de 10 pares de bases (Fig. 24-13d). Em um DNA circular fechado isolado, a tensão induzida pelo subenrolamento é geralmente acomodada pelo superenrolamento, em vez da separação das fitas, pelo fato de o espiralamento do eixo do DNA usualmente requerer menos energia do que a quebra das ligações de hidrogênio que estabilizam os pares de bases. Observe, entretanto, que o subenrolamento do DNA *in vivo* torna mais fácil separar as fitas de DNA, fornecendo acesso à informação que elas contenham.

Cada célula ativamente subenrola o seu DNA com a ajuda de um processo enzimático (descrito a seguir), e o estado de tensão resultante representa uma forma de armazenar energia. As células mantêm o DNA em um estado subenrolado para facilitar sua compactação pelo espiralamento. Além disso, o subenrolamento do DNA é também importante para as enzimas do metabolismo do DNA que devem induzir a separação das fitas como parte de sua função.

O estado de subenrolamento pode ser mantido apenas se o DNA estiver em um círculo fechado ou se ele estiver ligado e estabilizado por proteínas de tal forma que as fitas não estejam livres para rodar uma em relação à outra. Se houver uma quebra em uma das fitas de um DNA circular livre de proteínas, a rotação livre naquele ponto levará à reversão espontânea do DNA subenrolado ao estado de relaxamento. Em um DNA circular fechado sem quebras nas fitas, entretanto, o número de voltas da hélice não pode ser alterado sem, pelo menos, uma quebra transitória de uma das fitas de DNA. O número de voltas da hélice em uma molécula de DNA, portanto, fornece uma descrição precisa do superenrolamento.

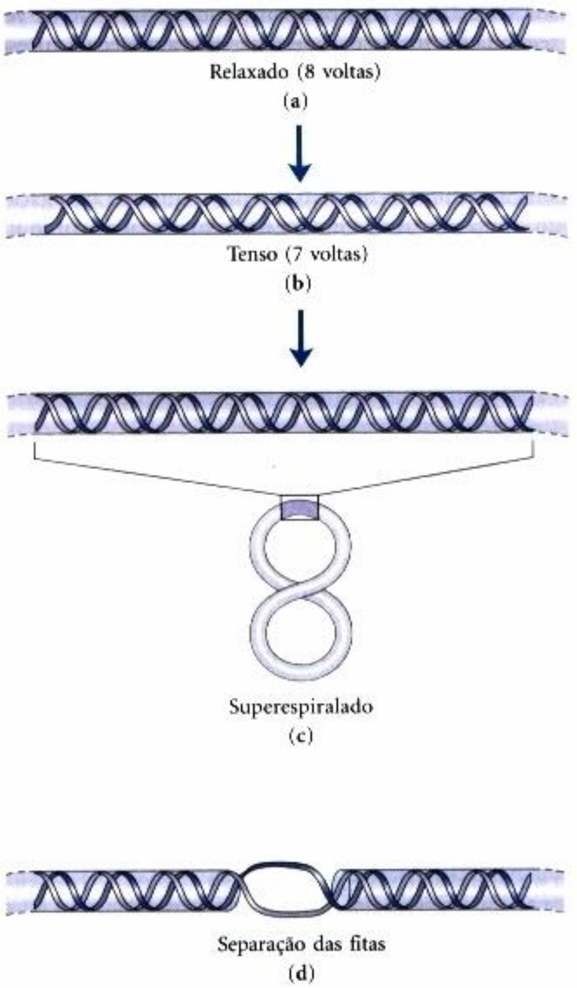


Figura 24-13 – Efeitos do subenrolamento do DNA. (**a**) Um segmento de DNA dentro de uma molécula circular fechada, de 84 pares de bases de comprimento, na sua forma relaxada com oito voltas helicoidais. (**b**) A remoção de uma volta induz uma tensão estrutural. (**c**) A tensão é geralmente acomodada pela formação de uma superespira. (**d**) O subenrolamento do DNA de alguma forma também o torna mais fácil para separar as fitas. Em princípio, cada volta de subenrolamento facilitaria a separação das fitas por cerca de 10 pares de bases, como mostrado. Entretanto, o pareamento de bases por pontes de hidrogênio geralmente evitaria a separação das fitas em uma distância tão curta que o efeito se tornaria importante apenas para DNAs mais longos e níveis maiores de subenrolamento do DNA.

O DNA subenrolado é definido pelo número de ligação topológica

A topologia fornece um certo número de idéias que são úteis nesta discussão, particularmente o conceito de **número de ligação.** O número de ligação é uma propriedade topológica porque ela não varia quando o DNA de dupla fita for curvado ou deformado, desde que ambas as fitas do DNA permaneçam intactas. O conceito de número de ligação (Lk) é ilustrado na Figura 24-14. Começamos visualizando a separação das duas fitas de um DNA de fita dupla circular. Se as duas fitas estão ligadas, como mostrado na Figura 24-14a, elas estão efetivamente unidas pelo que pode ser descrito como uma ligação topológica. Mesmo que todas as pontes de hidrogênio e as interações de empilhamento das bases fossem abolidas, de forma tal que as fitas não tivessem contato físico, essa ligação topológica ainda ligaria as duas fitas. Visualize uma das fitas circulares como o limite de uma superfície imaginária (tal como um filme de sabão espalhando-se pelo espaço emoldurado por um fio circular antes que você sopre uma bolha de sabão). O número de ligação pode ser definido rigorosamente como o número de vezes que a segunda fita fura esta superfície. Para a molécula apresentada na Figura 24-14a, $Lk = 1$; para a da Figura 24-14b, $Lk = 6$. O número de ligação de um DNA circular é sempre inteiro. Por convenção, se as ligações entre duas fitas de DNA estão arranjadas de tal forma que as fitas estejam entrelaçadas em uma hélice que tenha a orientação da mão direita, o número de ligação é definido como positivo (+); para fitas entrelaçadas como uma hélice da mão esquerda, o número de ligação é negativo (–). Números de ligação negativos, para todos os propósitos práticos, não são encontrados nos estudos do DNA.

Podemos agora estender estas idéias para um DNA circular fechado com 2.100 pares de bases (Fig. 24-15). Quando a molécula estiver relaxada, o número de ligação é simplesmente o número de pares de bases por volta, que é próximo de 10,5; nesse caso, $Lk = 200$. Para uma molécula de DNA circular ter uma propriedade topológica como o número de ligação, nenhuma fita pode conter quebra. Se houver uma quebra em qualquer fita, ela pode, em princípio, desenrolar-se e separar-se completamente. Nesse caso, nenhuma ligação topológica existe, e o Lk é indefinido (Fig. 24-15b).

Podemos agora descrever o subenrolamento do DNA em termos de variação do número de ligação. O número de ligação no DNA relaxado, chamado de Lk_0, é usado como referência. Para a molécula mostrada na Figura 24-15a, $Lk_0 = 200$; se duas voltas forem removidas dessa molécula, Lk será igual a 198. A variação pode ser descrita pela equação:

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 198 - 200 = -2$$

Freqüentemente, é conveniente exprimir a variação do número de ligação em termos de uma quantidade que é independente da extensão da molécula de DNA. Essa quantidade, chamada de **diferença de ligação específica (σ)**, ou **densidade super-helicoidal**, que é uma medida do número de voltas removidas relativas àquelas presentes no DNA relaxado:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}$$

No exemplo da figura 24-15c, $\sigma = -0{,}01$, que significa que 1% (2 em 200) das voltas da hélice presentes no DNA (na sua forma B) foram removidas. O grau de subenrolamento nos DNAs celulares geralmente cai no intervalo de 5 a 7%, ou seja, $\sigma = -0{,}05$ a $-0{,}07$. O sinal negativo de σ denota que a variação no número de ligação se deve ao subenrolamento do DNA. O superespiralamento induzido pelo subenrolamento é, portanto, definido como um

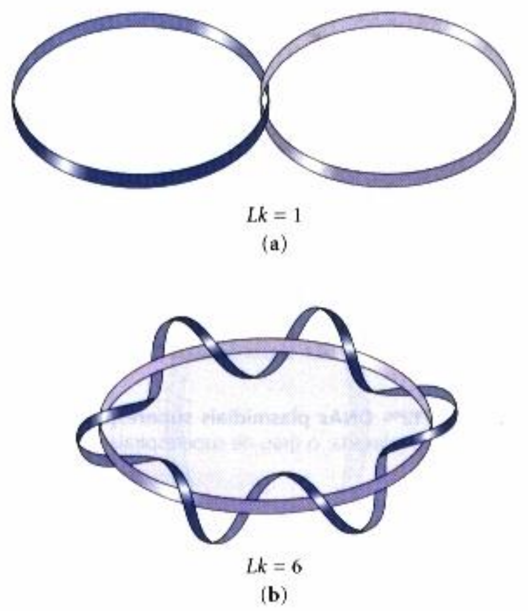


Figura 24-14 – Número de ligação, *Lk*. Aqui, como usual, cada tira azul representa uma fita de uma molécula de DNA de fita dupla. Para a molécula em (**a**), $Lk = 1$. Para a molécula em (**b**), $Lk = 6$. Uma das fitas em (**b**) é mantida não torcida, com propósitos ilustrativos, para definir a borda de uma superfície imaginária (sombreada em azul). O número de vezes que a fita contorcida penetra essa superfície fornece uma definição rigorosa do número de ligação.

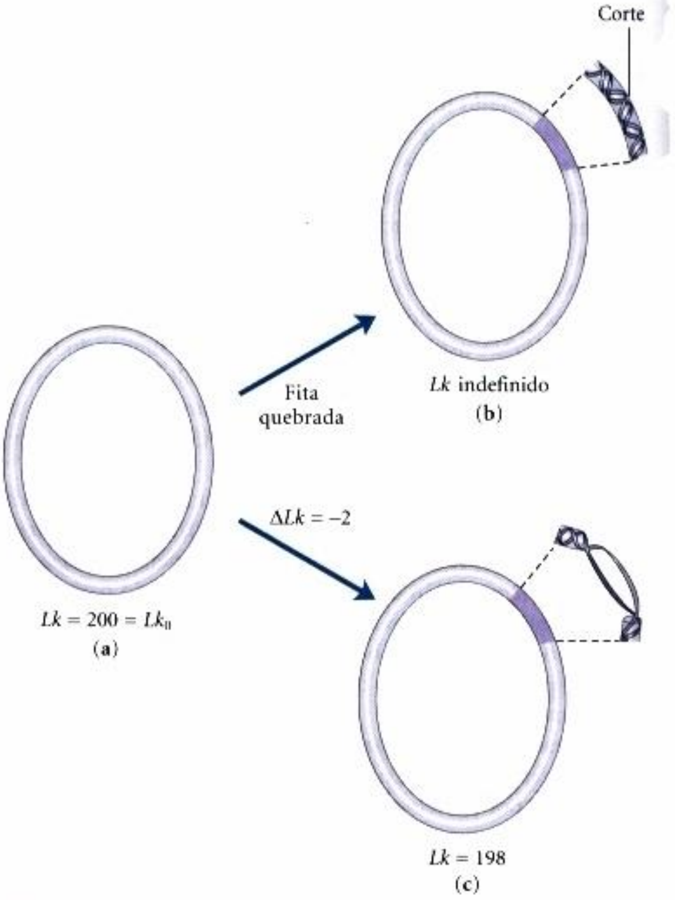


Figura 24-15 – Número de ligação aplicado para moléculas de DNA circulares fechadas. Um DNA circular de 2.100 pares de bases é mostrado em três formas: (**a**) relaxada, $Lk = 200$; (**b**) relaxada com um furo (quebra) em uma das fitas, Lk indefinido; (**c**) subenrolada de duas voltas, $Lk = 198$. A molécula subenrolada geralmente ocorre como uma molécula superespiralada, mas o subenrolamento também facilita a separação das fitas do DNA.

superespiralamento negativo. Contrariamente, sob algumas condições, o DNA pode ser superenrolado, e o superespiralamento resultante é definido como positivo. Observe que o caminho torcido tomado pelo eixo da hélice do DNA, quando o DNA estiver subenrolado (superespiralamento negativo), é a imagem especular daquele adquirido quando o DNA está superenrolado (superespiralamento positivo, Fig. 24-16). O superespiralamento não é um processo ao acaso; o caminho do superespiralamento está largamente prescrito pela tensão da torção imposta ao DNA pela diminuição ou pelo aumento do número de ligação relativo ao DNA-B.

O número de ligação pode ser alterado por ±1 pela quebra de uma fita de DNA, rodando uma das extremidades 360° sobre a fita não quebrada e reunindo as extremidades quebradas. Essa alteração não tem efeito no número de pares de bases ou no número de átomos em uma molécula circular de DNA. Duas formas de um dado DNA circular, que difiram apenas em uma propriedade topológica como o número de ligação, são referidas como **topoisômeros.**

O número de ligação pode ser dividido em dois componentes estruturais chamados de contorção (*Wr* — "writhe") e distorção (*Tw* — "twist") (Fig. 24-17). Eles são mais difíceis de descrever do que o número de ligação, mas a contorção pode ser pensada como uma medida do espiralamento do eixo da hélice, e a distorção, como determinante da distorção local ou do relacionamento espacial dos pares de bases vizinhos. Quando ocorre uma variação no número de ligação, algo da tensão resultante é usualmente compensado pela contorção (superespiralamento), e algo, pela variação na distorção, fornecendo a equação:

$$Lk = Tw + Wr$$

Distorção e contorção são propriedades geométricas e não-topológicas porque elas podem ser alteradas pela deformação de uma molécula de DNA circular fechada. Além disso, *Tw* e *Wr* não precisam ser números inteiros.

Além de causar o superenrolamento e tornar a separação das fitas algo mais fácil, o subenrolamento do DNA facilita várias alterações estruturais na molécula. Elas são de importância fisiológica menor, mas ajudam a ilustrar o efeito do subenrolamento. Lembre-se de que uma cruz (veja Fig. 10-21) geralmente contém algumas poucas bases não-pareadas; o DNA subenrolado ajuda a manter a separação da fita requerida (Fig. 24-18). Além disso, o subenrolamento de uma hélice do DNA de orientação da mão direita facilita a formação de pequenas regiões de DNA-Z da mão esquerda, em que a seqüência de DNA é consistente com a formação do DNA-Z (Capítulo 10).

As topoisomerases catalisam alterações no número de ligação do DNA

O superespiralamento do DNA é um processo precisamente regulado que influencia muitos aspectos do metabolismo do DNA. Toda célula possui enzimas cuja única função é subenrolar e/ou relaxar o DNA. Enzimas que aumentam ou diminuem o grau de subenrolamento do DNA são chamadas de **topoisomerases**, e a propriedade do DNA que elas afetam é o número de ligação. Essas enzimas desempenham um papel importante em processos como a replicação e o empacotamento do DNA. Há duas classes de topoisomerases. As topoisomerases do tipo I agem pela quebra transitória de uma das duas fitas do DNA, rodando uma das extremidades sobre a fita não quebrada e reunindo as extremidades quebradas; elas alteram o *Lk* em aumentos de 1. As topoisomerases do tipo II quebram ambas as fitas do DNA e alteram o *Lk* em aumentos de 2.

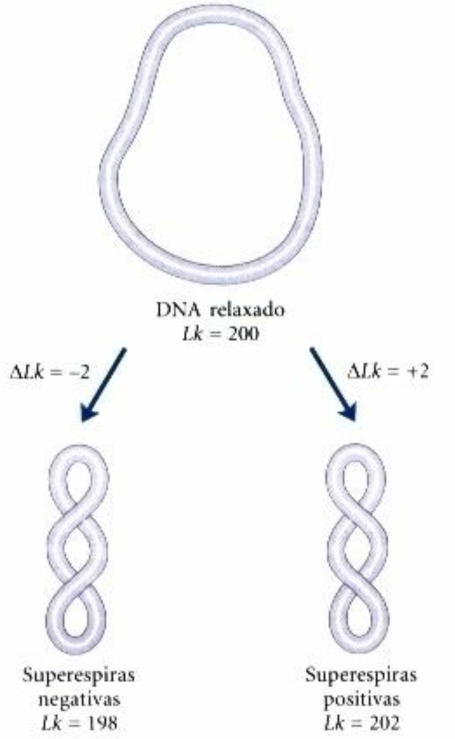
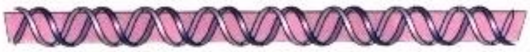
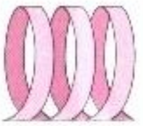


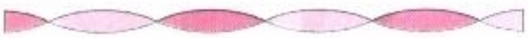
Figura 24-16 – Superespiralamento positivo e negativo. Para a molécula de DNA relaxada da figura 24-15a, o sub ou superenrolamento por duas voltas da hélice (*Lk* = 198 ou 202) produzirá superespiralamento negativo ou positivo, respectivamente. Observe a distorção do eixo do DNA em direções opostas nos dois casos.



Tira reta (DNA relaxado)
(a)



Grande contorção, pequena alteração na distorção
(b)



Zero de contorção, grande alteração na distorção
(c)

Figura 24-17 – Modelo de tira para ilustrar a distorção e a contorção. (**a**) A tira rósea representa o eixo de uma molécula de DNA relaxada. A tensão introduzida pela distorção da tira (subenrolando o DNA) pode ser manifestada como (**b**) contorção ou (**c**) distorção. Alterações no número de ligação são usualmente acompanhadas por alterações tanto na contorção quanto na distorção.

Os efeitos dessas enzimas podem ser demonstrados usando-se a eletroforese em gel de agarose (Fig. 24-19). Uma população de DNAs plasmidiais idênticos com o mesmo número de ligação migrará como bandas discretas durante a eletroforese. Topoisômeros com valores de *Lk*, diferindo por apenas 1, podem ser separados por esse método, de forma tal que alterações no número de ligação induzidas pelas topoisomerases podem ser facilmente observadas.

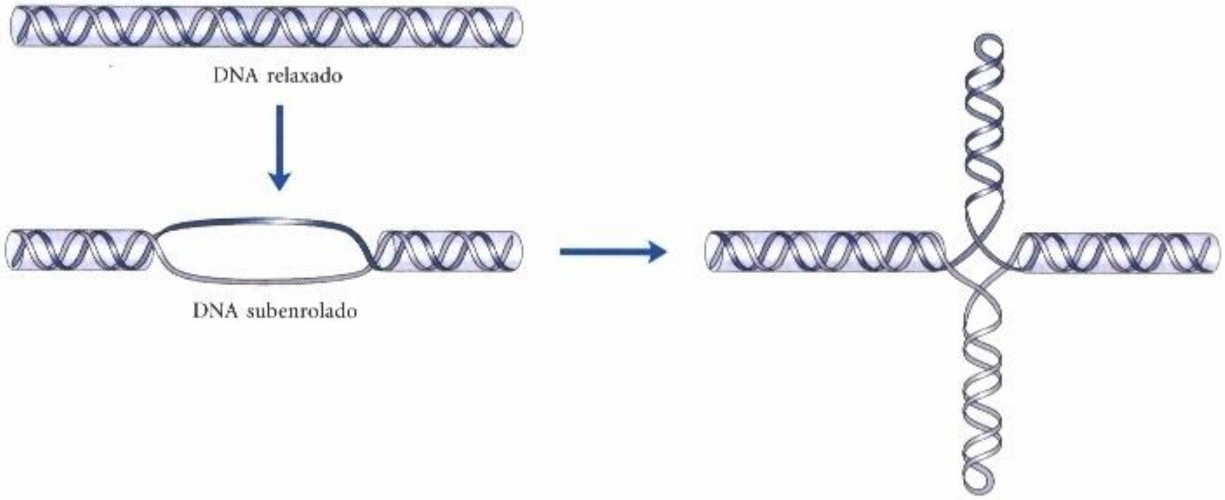


Figura 24-18 – Promoção de estruturas cruciformes pelo subenrolamento do DNA. Em princípio, as cruzes podem formar-se em seqüências palindrômicas (veja Fig. 10-21), mas elas raramente ocorrem em DNA relaxado, porque o DNA linear acomoda mais pares de bases do que a estrutura cruciforme. O subenrolamento do DNA facilita a separação de fitas necessárias para promover a formação cruciforme em seqüências apropriadas.

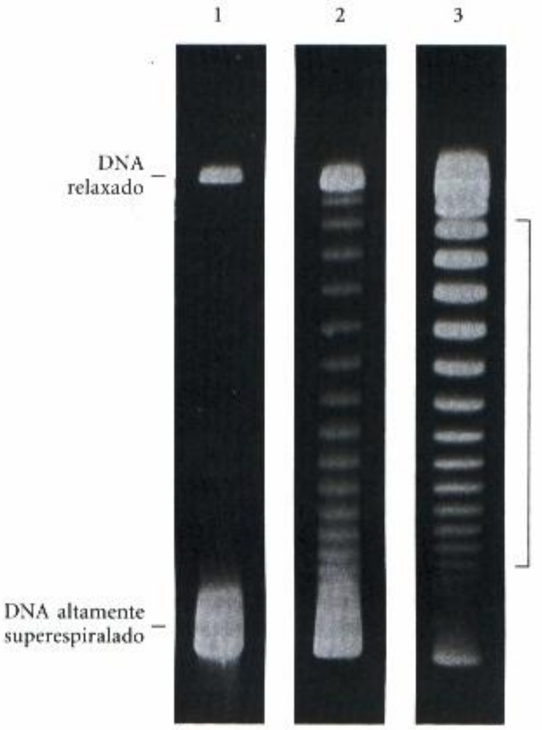


Figura 24-19 – Alterações no número de ligação catalisadas pelas topoisomerases. Nesse experimento, todas as moléculas de DNA possuem o mesmo número de pares de bases, mas exibem alguma variação no grau de superenrolamento. Pelo fato de as moléculas de DNA superespiraladas serem mais compactas do que as moléculas relaxadas, elas migram mais rapidamente durante a eletroforese no gel. Os géis mostrados aqui separam topoisômeros (movendo-se do topo ao fundo) dentro de um intervalo limitado de densidade super-helicoidal. Na raia 1, o DNA altamente superespiralado migra em uma única banda, mesmo que vários topoisômeros diferentes possam estar presentes. As raias 2 e 3 ilustram o efeito do tratamento do DNA superespiralado com a topoisomerase do tipo I; o DNA, na raia 3, foi tratado por um tempo mais longo do que aquele da raia 2. Como a densidade super-helicoidal do DNA é reduzida até o ponto em que ela corresponde ao intervalo no qual o gel pode discriminar os topoisômeros individuais, bandas distintas aparecem. Bandas indicadas pelo colchete próximo da raia 3 contêm círculos de DNA com o mesmo número de ligação.

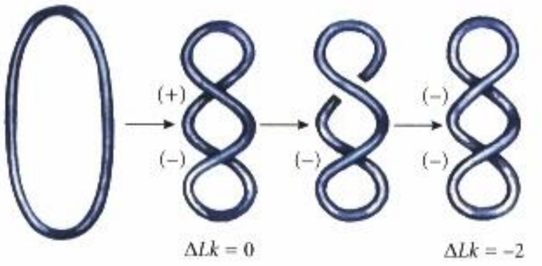


Figura 24-20 – Mecanismo da DNA girase. A topoisomerase II da *E. coli* (DNA girase) altera o número de ligação das moléculas circulares do DNA por um mecanismo não usual. A topoisomerase liga-se ao DNA de forma que duas regiões de uma molécula de DNA são cobertas em uma configuração específica no complexo ligado, um cruzamento ou nó positivo (+). Em qualquer DNA circular, um nó compensador (–) (um cruzamento em que as fitas são cobertas da maneira oposta) forma-se espontaneamente em qualquer lugar na molécula do DNA. Ambas as fitas de um segmento de DNA são quebradas, o outro segmento passa através da quebra e esta é resselada. O produto contém dois nós (–). A alteração na estrutura reflete uma alteração no *Lk* de –2.

Pelo menos quatro topoisomerases individualmente diferentes (I até IV) ocorrem na *E. coli*. As topoisomerases do tipo I (topoisomerases I e III), geralmente, relaxam o DNA, removendo superespiras negativas (aumentando o *Lk*). Uma enzima bacteriana do tipo II, chamada ou de topoisomerase II ou DNA girase, pode introduzir superespiras negativas (diminuindo o *Lk*). Elas usam a energia do ATP e um mecanismo surpreendente para conseguir isso (Fig. 24-20). O grau de superenrolamento do DNA bacteriano é mantido pela regulação da atividade final das topoisomerases I e II.

Células eucarióticas também possuem as topoisomerases dos tipos I e II. As topoisomerases I e III são ambas do tipo I. Os dois tipos de topoisomerase II, topoisomerase IIα e IIβ, não conseguem subenrolar o DNA (introduzir superespiras negativas), embora ambas possam relaxar tanto superespiras positivas quanto negativas. Consideraremos uma provável origem das superespiras negativas nas células eucarióticas em nossa discussão sobre a cromatina mais adiante neste capítulo.

A compactação do DNA requer uma forma especial de superespiralamento

Moléculas superespiraladas de DNA são uniformes em vários aspectos. As superespiras estão no sentido da mão direita na molécula do DNA negativamente superespiralada (Fig. 24-16), e elas tendem a se estender e estreitar em vez de se compactar, freqüentemente com ramificações múltiplas (Fig. 24-21). Nas densidades super-helicoidais, normalmente encontradas nas células, a extensão do eixo da superespira, incluindo ramificações, é cerca de 40% da extensão do próprio DNA. Esse tipo de superespiralamento é referido como **plectonêmico** (do grego *plektos*, "distorcido" e *nema*, "fio"). Este termo pode ser aplicado a qualquer estrutura em que as fitas estejam entrelaçadas em alguma maneira simples e regular, e ele descreve bem a estrutura geral do superenrolamento em solução.

Embora o superenrolamento plectonêmico seja a forma observada nos DNAs isolados no laboratório, ele não oferece a compactação necessária para empacotar o DNA na célula. Uma segunda forma de superenrolamento, chamada de **superenrolamento solenoidal** (Fig. 24-22), pode ser adotada por um DNA subenrolado. Em vez das superespiras estendidas no sentido da mão direita, característica da forma plectonêmica, o superenrolamento solenoidal envolve voltas apertadas, no sentido da mão esquerda, semelhante à forma tomada por uma mangueira de jardim organizadamente enrolada em uma roda. Embora suas estruturas sejam dramaticamente diferentes, os superenrolamentos plectonêmico e solenoidal são duas formas de superenrolamento negativo que podem ser tomados pelo *mesmo* segmento de DNA subenrolado. As duas formas são facilmente interconversíveis. Embora a forma plectonêmica seja mais estável em solução, a forma solenoidal pode ser estabilizada pela ligação de proteínas e é a forma encontrada na cromatina. Ela fornece um maior grau de compactação (Fig. 24-22b). O superenrolamento solenoidal é o mecanismo pelo qual o subenrolamento contribui para a compactação do DNA.

Cromatina e Estrutura Nucleóide

O termo "cromossomo" é usado para se referir à molécula do ácido nucléico que é o repositário da informação genética em um vírus, uma bactéria, uma célula eucariótica ou uma organela. Ele também se refere aos corpos densamente coloridos vistos nos núcleos das células eucarióticas coradas, que podem ser visualizados ao microscópio óptico. Cromossomos eucarióticos aparecem como corpos claramente definidos no núcleo, no período imediatamente anterior e durante a mitose, o processo de divisão nuclear nas células somáticas. Nas células eucarióticas que não estão se dividindo, o material cromossômico, chamado de **cromatina**, é amorfo e parece estar disperso ao acaso por todo o núcleo. À medida que as células se preparam para dividir, a cromatina condensa-se e organiza-se em um número bem definido de cromossomos, específico para a espécie (veja Fig. 24-7).

A cromatina consiste de fibras que contêm proteína e DNA em massas aproximadamente iguais, mais uma pequena quantidade de RNA. O DNA, na cromatina, está fortemente associado a proteínas chamadas de **histonas**, que empacotam e ordenam o DNA em unidades estruturais, chamadas de **nucleossomos** (Fig. 24-23). Também encontradas na cromatina estão muitas proteínas não-histônicas, algumas das quais regulam a expressão de genes específicos (Capítulo 28). Começando com os nucleossomos, o DNA cromossômico eucariótico é empacotado em uma sucessão de estruturas de ordem superior, que no fim produz os cromossomos compactos vistos ao microscópio óptico. Voltamos agora à descrição dessa estrutura nos eucariotos e a compararemos com o empacotamento do DNA nas células bacterianas.

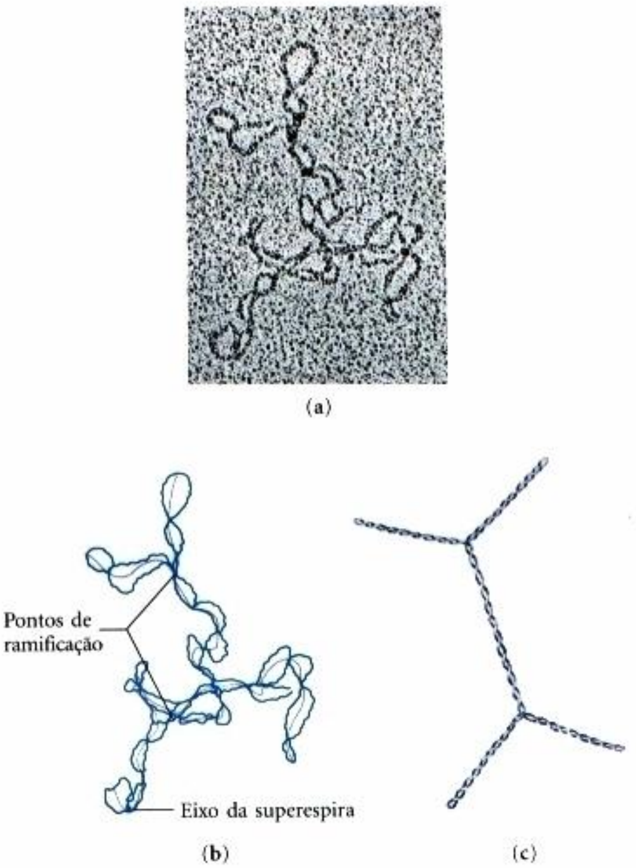


Figura 24-21 – Superenrolamento plectonômico. (**a**) Uma eletromicrografia do DNA plasmidial plectonemicamente superespiralado e (**b**) uma interpretação da estrutura observada. As linhas púrpuras mostram o eixo da superespira. Observe a ramificação dessa superespira. (**c**) Uma representação idealizada dessa estrutura.

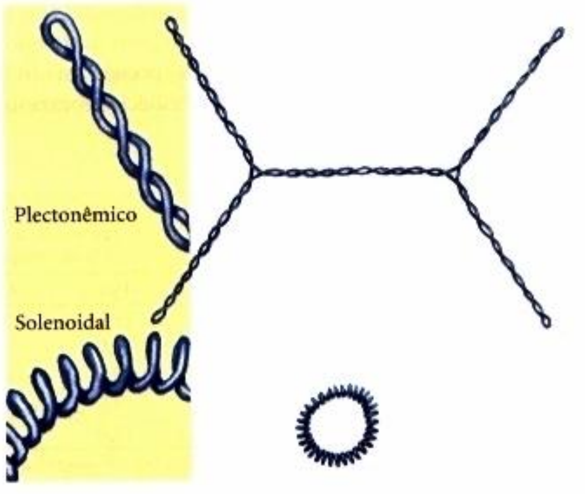


Figura 24-22 – Superenrolamento plectonêmico e solenoidal. (**a**) O superenrolamento plectonêmico toma a forma de espiras estendidas da mão direita. O superenrolamento solenoidal negativo toma a forma de voltas apertadas no sentido da mão esquerda em torno de uma estrutura imaginária semelhante a um tubo. As duas formas são facilmente interconversíveis, embora a forma solenoidal não seja geralmente observada, a menos que certas proteínas se liguem ao DNA. (**b**) Superenrolamento plectonêmico e solenoidal da mesma molécula de DNA, desenhada em escala. O superenrolamento solenoidal fornece um grau muito maior de compactação.

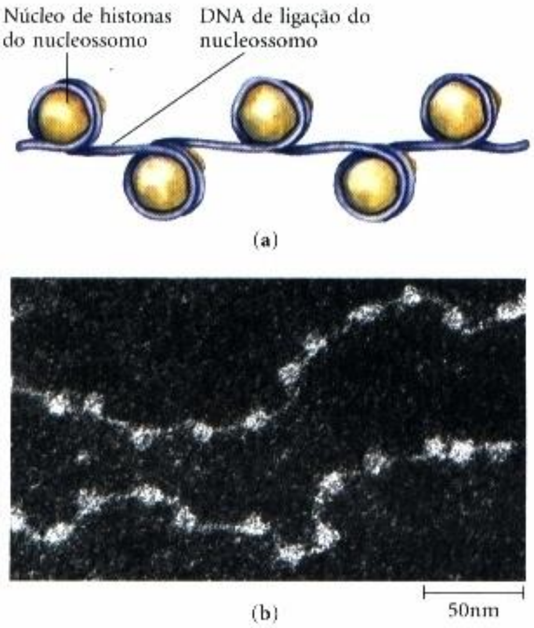

Núcleo de histonas do nucleossomo
DNA de ligação do nucleossomo
(a)
(b)
50nm

Figura 24-23 – Nucleossomos. Nucleossomos regularmente espaçados consistem de complexos de histonas ligados ao DNA. (**a**) Ilustração esquemática; (**b**) eletromicrografia.

As histonas são proteínas básicas pequenas

Encontradas na cromatina de todas as células eucarióticas, as histonas possuem pesos moleculares entre 11.000 e 21.000 e são muito ricas nos aminoácidos básicos, arginina e lisina (juntos eles perfazem cerca de um quarto dos resíduos de aminoácidos). Cinco classes principais de histonas são encontradas em todas as células eucarióticas, diferindo no peso molecular e na composição de aminoácidos (Tabela 24-3). As histonas H3 são praticamente idênticas, na seqüência de aminoácidos, em todos os eucariotos, como também o são as histonas H4, sugerindo conservação estrita das suas funções. Por exemplo, apenas dois dos 102 aminoácidos diferem entre as moléculas das histonas H4 da ervilha e da vaca e apenas oito diferenças existem entre as do homem e as da levedura. As histonas H1, H2A e H2B apresentam um grau menor de homologia de seqüência entre as espécies eucarióticas.

Tabela 24-3 – Tipo e propriedades das histonas

Histona	Peso molecular	Número de resíduos de aminoácidos	Conteúdo dos aminoácidos (% do total)	
			Lys	Arg
H1*	21.130	223	29,5	1,3
H2A*	13.960	129	10,9	9,3
H2B*	13.774	125	16,0	6,4
H3	15.273	135	9,6	13,3
H4	11.236	102	10,8	13,7

*O tamanho destas histonas varia um pouco de uma espécie para outra. Os números apresentados aqui são os das histonas bovinas.

Cada uma das histonas pode existir em diferentes formas porque as cadeias laterais de certos aminoácidos são enzimaticamente modificadas por metilação, ADP-ribosilação, fosforilação ou acetilação. Tais modificações alteram a carga elétrica líquida, a forma e outras propriedades das histonas, bem como as propriedades estruturais e funcionais da cromatina, e elas desempenham um papel na regulação da transcrição, como detalhado no Capítulo 28.

Os nucleossomos são as unidades organizacionais fundamentais da cromatina

O cromossomo eucariótico, descrito na Figura 24-7, representa a compactação de uma molécula de DNA de cerca de $10^5\mu m$ de comprimento em um núcleo da célula que tem tipicamente 5 a $10\mu m$ de diâmetro. Essa compactação envolve vários níveis de enrolamento altamente organizados. Submetendo os cromossomos a tratamentos que parcialmente os desenrolam, revela-se uma estrutura na qual o DNA está ligado fortemente a esferas de proteínas que freqüentemente estão regularmente espaçadas (Fig. 24-23). As contas, neste arranjo de "colar de contas", são complexos de histonas e DNA. A conta mais o DNA conectante que leva até a próxima conta formam o nucleossomo, a unidade fundamental de organização, sobre a qual o empacotamento de alta ordem da cromatina é construído. A conta de cada nucleossomo contém oito moléculas de histonas, duas cópias de cada uma das H2A, H2B, H3 e H4. O espaçamento entre as contas dos nucleossomos ao longo do DNA fornece uma unidade de repetição tipicamente de cerca de 200 pares de bases, das quais 146 estão fortemente ligados em volta do núcleo de oito histonas e o restante funciona como um elo de DNA entre as contas dos nucleossomos. A histona H1 liga-se ao elo de DNA. O tratamento brando da cromatina com enzimas que digerem o DNA causa a degradação preferencial do elo de DNA, liberando partículas de histonas que contêm ligados 146 pares de bases de DNA, que foram protegidos da digestão. Pesquisadores cristalizaram nucleossomos obtidos dessa forma, e a análise de difração de raios X revelou uma partícula feita de oito moléculas de histonas, com o DNA embrulhando-as na forma de uma superespira solenoidal com orientação da mão esquerda (Fig. 24-24).

Uma inspeção mais cuidadosa dessa estrutura revela porque o DNA eucariótico está subenrolado, embora as células eucarióticas não possuam enzimas que subenrolem o DNA. Lembre-se de que o enrolamento solenoidal do DNA nos nucleossomos é uma forma de superenrolamento adotado pelo DNA subenrolado (negativamente superespiralado). Enrolar fortemente o DNA em volta dos núcleos das histonas nas partículas nucleossômicas requer a remoção de cerca de uma volta da hélice no DNA. Quando o núcleo de proteína de um nucleossomo liga-se *in vitro* a um DNA circular fechado, relaxado, a ligação introduzirá uma superespira negativa. Esse processo de ligação não quebra o DNA ou não altera o número de ligação, mas a formação de uma superespira solenoidal negativa deve ser acompanhada por uma superespira positiva compensatória na região não-ligada do DNA (Fig. 24-25). Como mencionado anteriormente, as topoisomerases eucarióticas podem relaxar superespiras positivas. Relaxando a superespira positiva não-ligada deixa a superespira negativa fixa (isto por ela estar ligada ao núcleo das histonas do nucleossomo) e leva a uma diminuição global no número de ligação. Realmente, as topoisomerases têm-se provado necessárias para a montagem da cromatina, a partir de histonas e DNA circular fechado *in vitro*.

Um outro fator importante que afeta a ligação do DNA às histonas nos nucleossomos é a seqüência do DNA ligado. Os núcleos da histona não se ligam ao acaso ao DNA; ao contrário, eles tendem a se posicionar em certas localizações. Esse posicionamento não é completamente entendido, mas parece depender da abundância local dos pares de bases A=T no sulco secundário da hélice do DNA em que ela está em contato com as histonas (Fig. 24-26). O intenso enrolamento do DNA em volta do núcleo de histona dos nucleossomos requer a compressão do sulco secundário nesses pontos e um agregado de dois ou três pares de bases A=T torna essa compressão mais fácil.

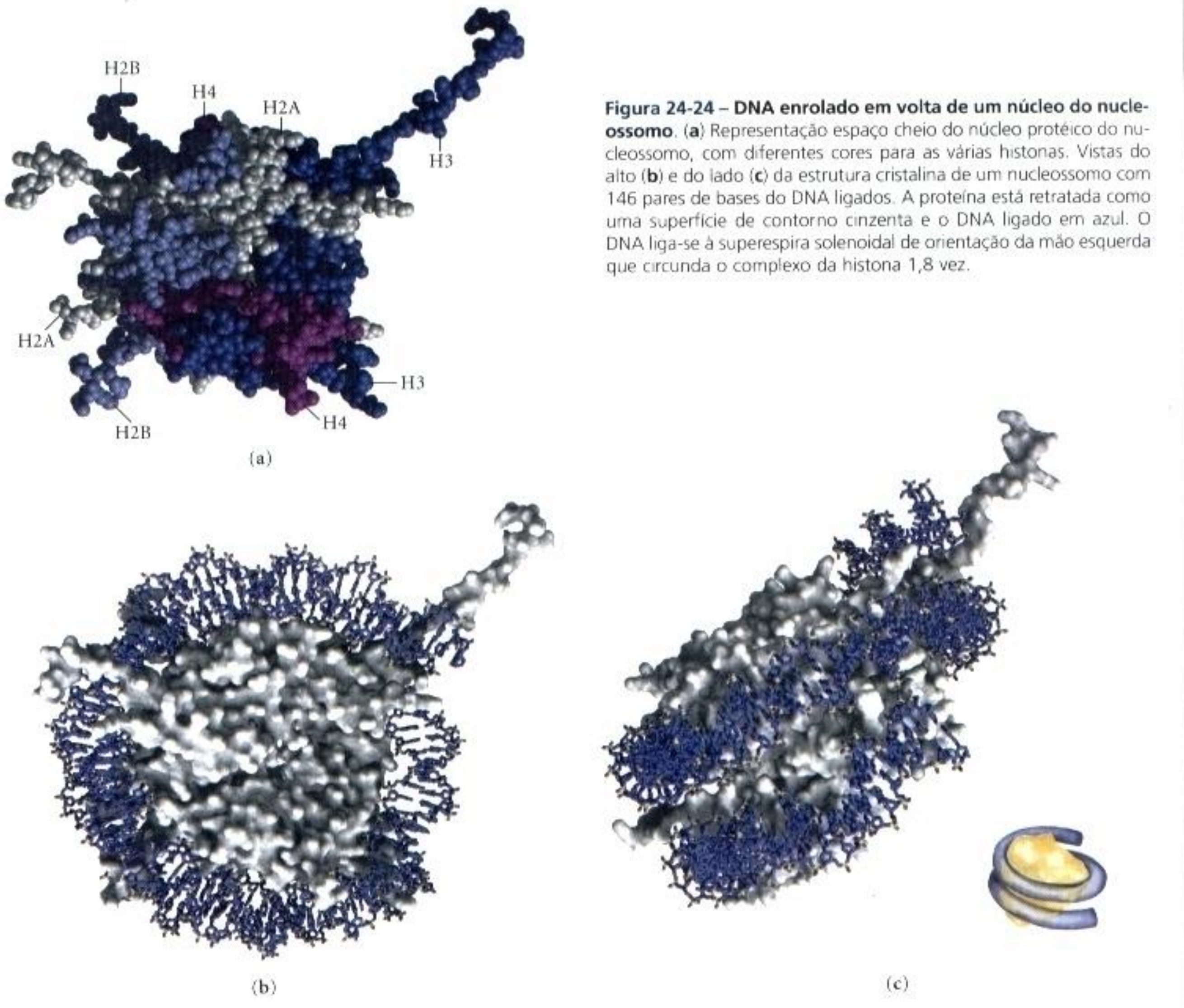

H2B
H4
H2A
H3
H2A
H3
H2B
H4
(a)
(b)
(c)

Figura 24-24 – DNA enrolado em volta de um núcleo do nucleossomo. (**a**) Representação espaço cheio do núcleo protéico do nucleossomo, com diferentes cores para as várias histonas. Vistas do alto (**b**) e do lado (**c**) da estrutura cristalina de um nucleossomo com 146 pares de bases do DNA ligados. A proteína está retratada como uma superfície de contorno cinzenta e o DNA ligado em azul. O DNA liga-se à superespira solenoidal de orientação da mão esquerda que circunda o complexo da histona 1,8 vez.

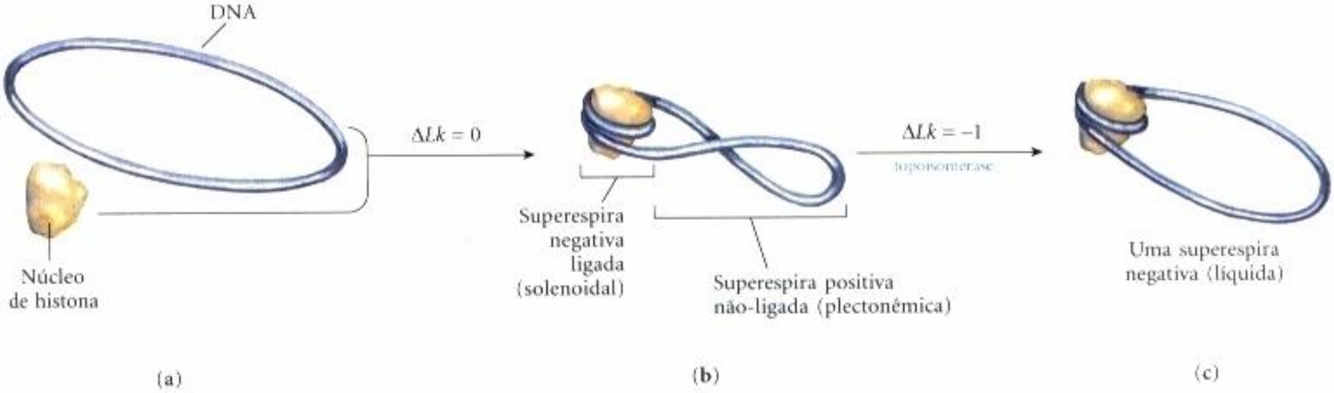

DNA
ΔLk = 0
ΔLk = −1
topoisomerase
Núcleo de histona
Superespira negativa ligada (solenoidal)
Superespira positiva não-ligada (plectonêmica)
Uma superespira negativa (líquida)
(a)
(b)
(c)

Figura 24-25 – Montagem da cromatina. (**a**) DNA circular fechado, relaxado. (**b**) A ligação de um núcleo de histonas para formar um nucleossomo induz uma superespira negativa. Na ausência de qualquer quebra de fitas, uma superespira positiva deve também ser formada em qualquer lugar no DNA ($\Delta Lk = 0$). (**c**) O relaxamento dessa superespira positiva pela topoisomerase deixa uma superespira negativa de saldo ($\Delta Lk = -1$).

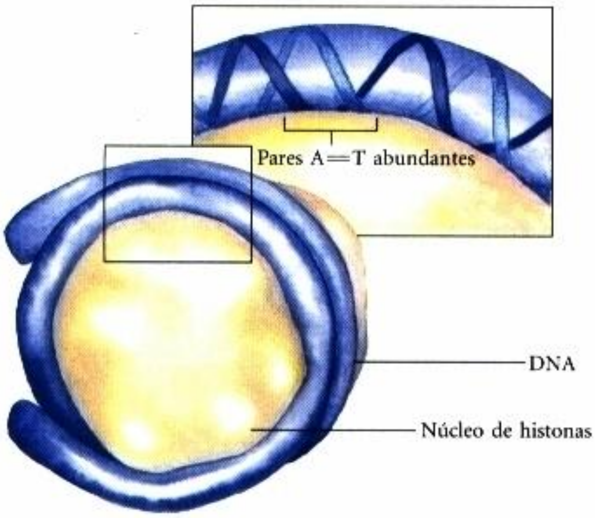


Figura 24-26 – Posicionamento de um nucleossomo para fazer melhor uso dos pares de bases A═T onde o núcleo das histonas está em contato com o sulco secundário da hélice do DNA.

Outras proteínas são requeridas para o posicionamento de alguns nucleossomos no DNA. Em vários organismos, foram descobertas proteínas que se ligam a uma seqüência específica e facilitam, então, a formação de um núcleo do nucleossomo. O posicionamento preciso do nucleossomo pode desempenhar um papel na expressão de alguns genes eucarióticos (Capítulo 28).

Os nucleossomos são empacotados em estruturas sucessivamente mais ordenadas

O enrolamento do DNA em volta do núcleo de um nucleossomo compacta-o cerca de sete vezes. A compactação total em um cromossomo, entretanto, é maior que 10.000 vezes — evidência ampla para níveis de organização estrutural ainda maiores. Nos cromossomos isolados por métodos muito brandos, os nucleossomos parecem ser organizados formando uma estrutura chamada de **fibra de 30nm** (Fig. 24-27). Esse empacotamento requer uma molécula de histona H1 por nucleossomo. A organização nas fibras de 30nm não se estende sobre todo o cromossomo, mas é pontuada por regiões que são ligadas por proteínas (não-histônicas) que se ligam a seqüências-específicas do DNA. A estrutura de 30nm também parece depender da atividade transcricional da região particular do DNA. Regiões que contêm genes transcritos estão aparentemente em um estado menos organizado, que contém pouca, se alguma, histona H1.

As fibras de 30nm, um segundo grau de organização da cromatina, fornece um grau de compactação do DNA de aproximadamente 100 vezes. O próximo nível de enrolamento não é bem entendido, mas parece que certas regiões do DNA associam-se a um andaime nuclear (Fig. 24-28). As regiões associadas ao andaime estão separadas por alças de DNA de, talvez, 20.000 a 100.000 pares de bases. O DNA em uma alça pode conter um conjunto de genes relacionados. Por exemplo, na *Drosophila*, conjuntos completos de genes que codificam histonas parecem estar agrupados em alças que estão unidas a sítios de ligação ao andaime (Fig. 24-29). O próprio andaime parece conter várias proteínas, notavelmente grandes quantidades de histona H1 (localizadas no interior da fibra) e a topoisomerase II. A presença da topoisomerase II enfatiza ainda mais a relação importante entre o subenrolamento do DNA e a montagem da cromatina. A topoisomerase II é tão importante para a montagem da cromatina que inibidores dessa enzima podem matar rapidamente as células em divisão. Várias drogas usadas na quimioterapia contra o câncer são inibidoras da topoisomerase II que permitem à enzima promover a quebra de fitas, mas não o seu resselamento.

Existe evidência para níveis de organização adicionais nos cromossomos eucarióticos, cada um aumentando, dramaticamente, o grau de compactação. Um modelo para alcançar essa compactação está ilustrado na Figura 24-30. A estrutura da cromatina de maior organização provavelmente varia de cromossomo a cromossomo, de uma região para outra em um mesmo cromossomo, e de momento a outro na vida de uma célula. Nenhum modelo único pode descrever adequadamente essas estruturas. Entretanto, o princípio é direto: a compactação do DNA, nos cromossomos eucarióticos, parece envolver espiras em cima de espiras em cima de espiras...

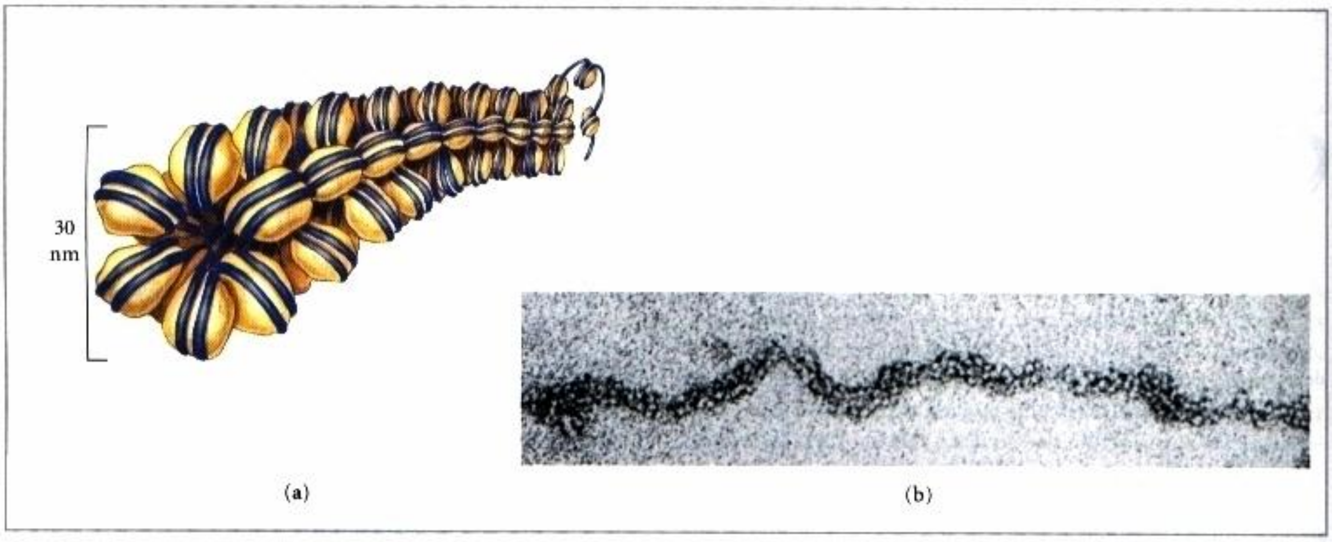


Figura 24-27 – A fibra de 30nm, um nível de organização superior dos nucleossomos. (**a**) Ilustração esquemática da estrutura provável da fibra, mostrando nucleossomos empacotados; (**b**) Eletromicrografia desta estrutura.

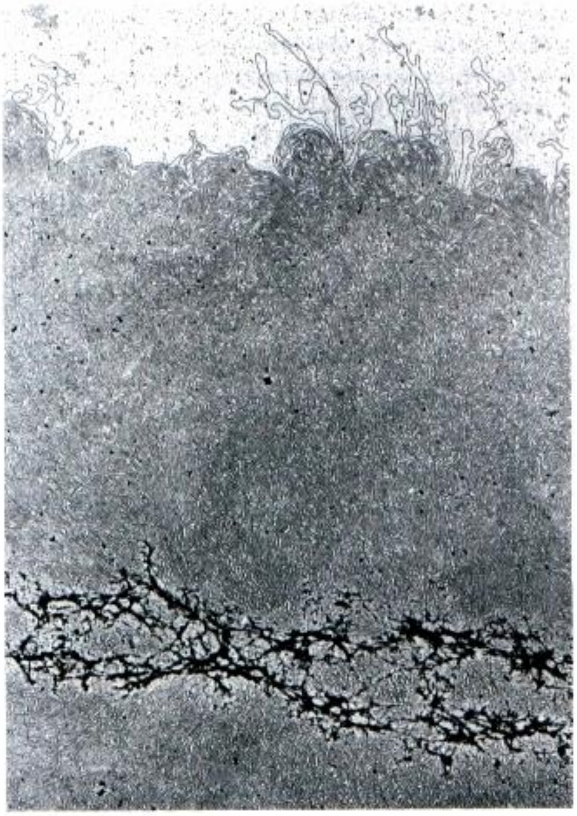


Figura 24-28 – Um cromossomo humano parcialmente desembaraçado, revelando numerosas alças de DNA ligadas a uma estrutura do tipo andaime.

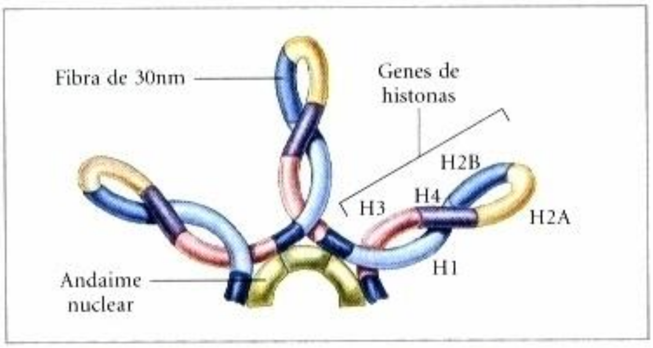

Fibra de 30nm
Genes de histonas
H2B
H3
H4
H2A
H1
Andaime nuclear

Figura 24-29 – Alças do DNA cromossômico ligadas a um andaime nuclear. O DNA nas alças está empacotado como fibras de 30nm, de forma que as alças representam o próximo nível de organização. As alças freqüentemente contêm grupos de genes com funções relacionadas. Conjuntos completos de genes, codificando genes de histona, como mostrados nesta ilustração esquemática, parecem estar agrupados em alças desse tipo. Ao contrário da maioria dos genes, todos os genes das histonas ocorrem em cópias múltiplas no genoma de muitos eucariotos.

O DNA bacteriano também é altamente organizado

Voltamos agora, brevemente, para a estrutura dos cromossomos bacterianos. O DNA bacteriano é compactado em uma estrutura chamada de **nucleóide**, que ocupa uma grande fração do volume da célula bacteriana (Fig. 24-31). O DNA das células bacterianas parece estar ligado a um ou mais pontos da superfície da membrana plasmática. Muito menos é conhecido sobre a estrutura do nucleóide do que da cromatina eucariótica. Na *E. coli*, parece existir uma estrutura do tipo andaime que organiza o cromossomo circular em uma série de domínios de alças, como foi descrito anteriormente para a cromatina. A organização local, fornecida pelos nucleossomos nos eucario-

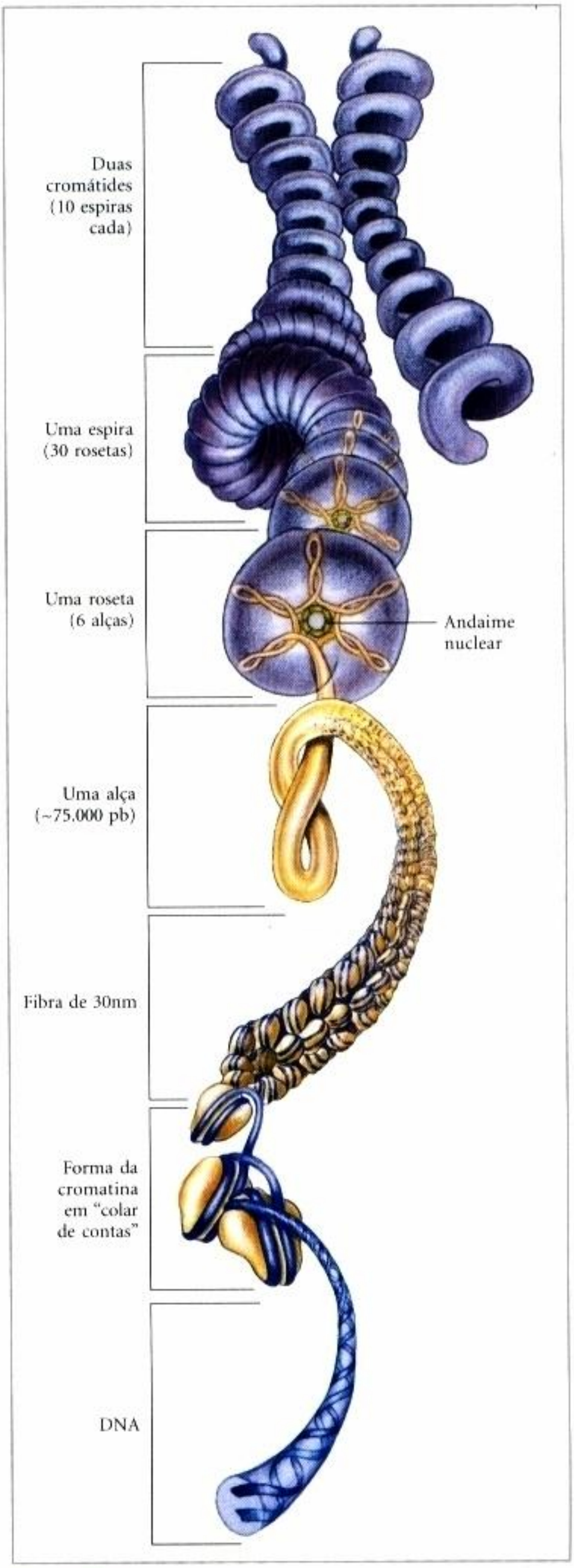

Duas cromátides (10 espiras cada)
Uma espira (30 rosetas)
Uma roseta (6 alças)
Andaime nuclear
Uma alça (~75.000 pb)
Fibra de 30nm
Forma da cromatina em "colar de contas"
DNA

Figura 24-30 – Modelo para níveis de organização que poderiam fornecer compactação em um cromossomo eucariótico. Os níveis tomam a forma de espira em cima de espiras. Nas células, estruturas de maior ordem (acima das fibras de 30nm) não parecem ser tão uniformes quanto as descritas aqui.

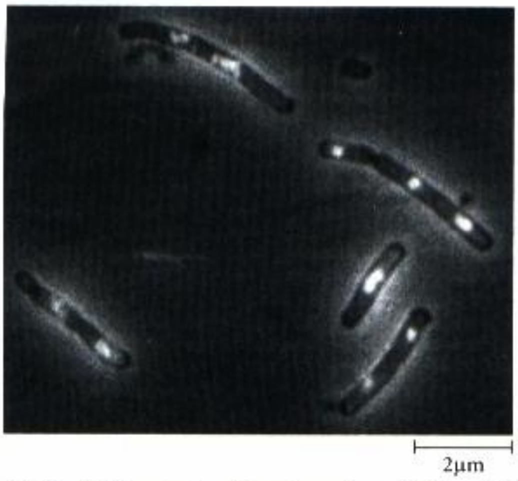


Figura 24-31 – Células da *E. coli* mostrando nucleóides. O DNA está corado com um corante que fluoresce quando exposto à luz ultravioleta. A área luminosa define o nucleóide. Observe que algumas células replicaram o seu DNA, mas ainda não sofreram divisão celular e, portanto, possuem nucleóides múltiplos.

tos, parece não estar duplicada por nenhuma estrutura comparável no DNA bacteriano. Proteínas do tipo histonas são abundantes na *E. coli* — o exemplo mais bem caracterizado é uma proteína com duas subunidades chamadas de HU (M_r 19.000) —, mas essas proteínas se ligam e dissociam em minutos, e não foi encontrada nenhuma estrutura regular, estável. O cromossomo bacteriano é uma estrutura relativamente dinâmica, possivelmente, refletindo um requerimento de acesso mais fácil à informação genética que contém. O ciclo da divisão celular pode ser tão curto quanto 15 minutos, enquanto uma célula eucariótica típica pode não se dividir por horas ou até mesmo meses. Além disso, uma fração muito maior do DNA procariótico é usada para codificar RNA e/ou produtos protéicos. As altas taxas do metabolismo celular na bactéria significam que uma proporção muito maior do DNA está sendo transcrita ou replicada em certo tempo do que na maioria das células eucarióticas.

Com esta visão geral da complexidade da estrutura do DNA, estamos agora prontos para voltar a uma discussão sobre o metabolismo do DNA.

Resumo

Genes são segmentos de um cromossomo que contêm informação para uma molécula funcional de um polipeptídeo ou RNA. Além dos genes, os cromossomos contêm uma variedade de seqüências reguladoras envolvidas na replicação, na transcrição e em outros processos. Os cromossomos eucarióticos possuem duas seqüências de DNA repetitivas especiais com funções importantes: centrômeros, que são pontos de ligação para o fuso mitótico, e telômeros, que ocorrem nas extremidades dos cromossomos. Muitos genes, nas células eucarióticas, e, ocasionalmente, nas bactérias, são interrompidos por seqüências não-codificadoras chamadas de íntrons. Os segmentos codificadores separados pelos íntrons são chamados de éxons.

As moléculas de DNA nos cromossomos são as maiores moléculas nas células. Muitos DNAs pequenos também ocorrem nas células, na forma de DNAs virais, plasmídios e (nos eucariotos) DNAs mitocondriais e cloroplastiais. Muitos DNAs, especialmente aqueles das bactérias, mitocôndrias e cloroplastos, são circulares. Os DNAs virais e cromossômicos têm uma característica em comum: eles são, em geral, muito mais longos do que as partículas virais ou células onde estão empacotados. O tamanho total do DNA de uma célula eucariótica é muito maior que aquele da célula bacteriana.

A maior parte dos DNAs celulares é superespiralada. O superespiralamento é uma manifestação da tensão estrutural conferida pelo subenrolamento da molécula do DNA. O subenrolamento diminui o número total das voltas da hélice do DNA relativo à forma B ou à relaxada. Para manter um estado de subenrolamento, o DNA deve ser um círculo fechado ou estar ligado a proteínas. Superespiras, resultantes do subenrolamento, são definidas como superespiras negativas. O subenrolamento é quantificado por um parâmetro topológico chamado de número de ligação, Lk. O número de ligação de um DNA circular fechado, relaxado, é usado como uma referência (Lk_0) e é igual ao número de pares de bases dividido pelo número de pares de bases por volta (aproximadamente 10,5). O subenrolamento é medido em termos da diferença de ligação específica ou σ, também chamado de densidade super-helicoidal, que é igual a $(Lk - Lk_0)/Lk_0$. Para os DNAs celulares, o σ tipicamente fica entre $-0{,}05$ e $-0{,}07$, o que significa que aproximadamente 5 a 7% das voltas das hélices no DNA foram removidas. O subenrolamento do DNA facilita a separação das fitas para as enzimas envolvidas no metabolismo do DNA. As superespiras plectonêmicas, no DNA superespiralado negativamente, têm o sentido da mão direita e a estrutura geral é estreita e estendida. O superespiralamento solenoidal, fornece um grau de compactação muito maior e predomina na célula.

DNAs que diferem apenas no seu número de ligação são chamados de topoisômeros. As enzimas que subenrolam e/ou relaxam o DNA são chamadas de topoisomerases e agem catalisando alterações no número de ligação. As duas classes de topoisomerases, tipos I e II, alteram o Lk em aumentos de 1 ou 2, respectivamente, por evento catalítico. Em uma célula bacteriana, o grau de superespiralamento do DNA é regulado pelas atividades das topoisomerases que aumentam e diminuem o número de ligação.

A unidade fundamental de organização na cromatina das células eucarióticas é o nucleossomo, que consiste de histonas e em um segmento de DNA de

200 pares de bases. O núcleo da partícula protéica, contendo oito histonas (duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4), é enrolado por um segmento de DNA (cerca de 146 pares de bases), que toma a forma de uma superespira solenoidal com orientação da mão esquerda. Os nucleossomos são organizados em fibras de 30nm, e as próprias fibras estão extensivamente enroladas para fornecer uma compactação de 10.000 vezes, requerida para acomodar um cromossomo eucariótico típico dentro do núcleo celular. O enrolamento de ordem superior envolve a ligação a um andaime nuclear que contém grandes quantidades de histona H1 e topoisomerase II. Os cromossomos bacterianos também são extensivamente compactados em uma estrutura chamada de nucleóide, mas o cromossomo parece ser muito mais dinâmico e irregular na estrutura do que a cromatina eucariótica, refletindo o menor ciclo celular e o metabolismo muito ativo de uma célula bacteriana.

Leitura Adicional

Geral

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, & Shao Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1474.

Novos segredos desse organismo muito comum nos laboratórios foram revelados.

Cozzarelli NR & Wang JC. (eds) (1990) *DNA Topology and Its Biological Effects*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Kornberg A & Baker TA. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, WH Freeman & Company, New York.

Um bom lugar para se começar a procurar informações adicionais sobre a estrutura e a função do DNA.

Lewin B. (1997) *Genes VI*, Oxford University Press, New York.

Os capítulos 21 a 27 são especialmente relevantes.

Lodish H, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, & Darnell J. (1999) *Molecular Cell Biology*, 4th edn, WH Freeman & Co., New York.

Uma outra referência geral excelente.

Genes e cromossomos

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, & Oliver SG. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-567.

A primeira seqüência completa de um genoma eucariótico.

Greider CW & Blackburn EH. (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci. Am.* **274** (February), 92-97.

Huxley C. (1997) Mammalian artificial chromosomes and chromosome transgenics. *Trends Genet.* **13**, 345-347.

Jurka J. (1998) Repeats in genomic DNA: mining and meaning. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 333-337.

Long M, de Souza SJ, & Gilbert W. (1995) Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 774-778.

Nugent CI & Lundblad V. (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* **12**, 1073-1085.

Schmid CW. (1996) Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **53**, 283-319.

Sharp PA. (1985) On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* **42**, 397-400.

Willard HF. (1996) Chromosome manipulation: a systematic approach toward understanding human chromosome structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **93**, 6847-6850.

Zakian VA. (1996) Structure, function and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 141-172.

Superespiralamento e topoisomerases

Berger JM. (1998) Type II DNA topoisomerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 26-32.

Boles TC, White JH, & Cozzarelli NR. (1990) Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **213**, 931-951.

Um estudo que define várias características fundamentais do DNA superespiralado.

Cozzarelli NR, Boles TC, & White JH. (1990) Primer on the topology and geometry of DNA supercoiling. In *DNA Topology and Its Biological Effects* (Cozzarelli NR & Wang JC, eds), pp. 139-184, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Esse artigo fornece uma discussão mais avançada e completa.

Lebowitz J. (1990) Through the looking glass: the discovery of supercoiled DNA. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 202-207.

Uma nota histórica curta e interessante.

Wang JC. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635-692.

Cromatina e nucleossomos

Felsenfeld G, Boyes J, Chung J, Clark D, & Studitsky V. (1996) Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9384-9388.

Filipski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M, & Walker PR. (1990) Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J.* **9**, 1319-1327.

Gasser SM. (1995) Chromosome structure: coiling up chromosomes. *Curr. Biol.* **5**, 357-360.

Kornberg RD. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.

O trabalho clássico que introduz o modelo de subunidade para a cromatina.

Travers AA. (1994) Chromatin structure and dinamycs. *Bioessays* **16**, 657-662.

Wolffe AP. (1994) Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 240-244.

Zlatanova J & van Holde K. (1996) The linker histones and chromatin structure: new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **52**, 217-259.

Problemas

1. Empacotamento do DNA em um vírus. O DNA do bacteriófago T2 possui peso molecular de 120×10^6 em uma cabeça de cerca de 210nm de comprimento. Calcule o comprimento do DNA (assuma que o peso molecular de um par de nucleotídeos é 650) e compare-o com o tamanho da cabeça do T2.

2. O DNA do fago M13. O DNA do bacteriófago M13 possui a seguinte composição de bases: A, 23%; T, 36%; G, 21%; C, 20%. O que isso nos conta sobre o DNA do fago M13?

3. O genoma do *Mycoplasma*. O genoma completo da bactéria mais simples conhecida, o *Mycoplasma genitalium*, é uma molécula de DNA circular com 580.070 pares de bases. Calcule o peso molecular e a extensão de contorno dessa molécula (quando relaxada). Qual é o Lk_0 para o cromossomo do *Mycoplasma*? Se $\sigma = -0,06$, qual é o Lk?

4. Tamanho dos genes eucarióticos. Uma enzima isolada do fígado de rato possui uma cadeia polipeptídica de 192 resíduos de aminoácidos, que é codificada por um gene contendo 1.440 pares de bases. Explique a relação entre o número de resíduos de aminoácidos nessa enzima e o número de pares de nucleotídeos no seu gene.

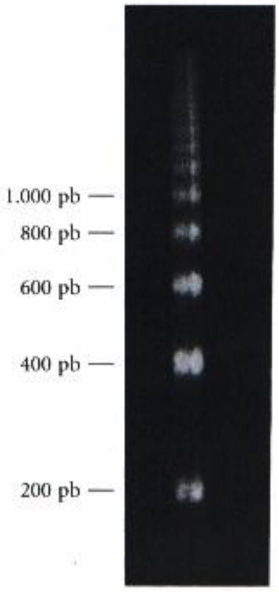
5. Número de ligação. Uma molécula de DNA circular fechada, na sua forma relaxada, possui um Lk de 500. Quantos pares de bases, aproximadamente, estão nesse DNA? Como o número de ligação é alterado (aumenta, decresce, não se altera, torna-se indefinido) quando (a) um complexo protéico é ligado para formar um nucleossomo, (b) uma fita de DNA é quebrada, (c) DNA girase e ATP são adicionados à solução de DNA, ou (d) a dupla hélice é desnaturada pelo calor?

6. A densidade super-helicoidal. O bacteriófago λ infecta a *E. coli* integrando-se ao seu DNA no cromossomo bacteriano. O sucesso dessa recombinação depende da topologia do DNA na *E. coli*. Quando a densidade super-helicoidal (σ) do DNA da *E. coli* for maior do que $-0,045$, a probabilidade de integração é $< 20\%$; quando σ é menor do que $-0,06$, a probabilidade é $> 70\%$.

O DNA isolado de uma cultura de *E. coli* apresenta um comprimento de 13.800 pares de bases e um Lk de 1,222. Calcule σ para esse DNA e prediga a probabilidade que o bacteriófago λ será capaz de infectar essa cultura.

7. Estrutura do DNA. Explique como o subenrolamento de uma hélice do DNA-B pode facilitar ou estabilizar a formação do DNA-Z.

8. Cromatina. Uma evidência inicial que ajudou a definir a estrutura do nucleossomo é ilustrada pelo gel de agarose mostrado a seguir, em que as bandas espessas representam DNA. Ele foi gerado, tratando a cromatina rapidamente com uma enzima que degrada o DNA, removendo, então, toda proteína e submetendo o DNA purificado à eletroforese. Os números ao lado do gel denotam a posição em que um DNA linear do tamanho indicado (em pares de bases) migraria. O que esse gel indica sobre a estrutura da cromatina? Por que as bandas de DNA são espessas e espalhadas em vez de finas?



9. Cromossomos artificiais de levedura (YACs). YACs são usados para clonar grandes pedaços de DNA nas células de levedura. Quais são os três tipos de seqüências de DNA requeridos para garantir a replicação e a propagação adequadas de um YAC em uma célula de levedura?

CAPÍTULO 25

Metabolismo do DNA

O DNA ocupa uma posição única e central entre as macromoléculas biológicas como repositório da informação genética. As seqüências nucleotídicas do DNA codificam as estruturas primárias de todos os RNAs e proteínas celulares e, por meio das enzimas, podem afetar indiretamente a síntese de todos os constituintes celulares. Essa passagem da informação do DNA para o RNA e as proteínas direciona o tamanho, a forma e a função de todos os seres vivos.

O DNA é um dispositivo magnífico para o armazenamento estável da informação genética. O termo "armazenamento estável", entretanto, transmite uma visão estática e incompleta. Ele não capta a complexidade dos processos pelos quais a informação é preservada em um estado inalterável e, então, transmitida de uma geração de células para a seguinte. O metabolismo do DNA compreende tanto o processo pelo qual cópias fidedignas das moléculas do DNA são sintetizadas (replicação), como os processos que afetam a própria estrutura da informação (reparo e recombinação). Juntas, essas atividades são o foco deste capítulo.

O metabolismo do DNA é caracterizado pela exigência de um grau refinado de precisão. A química de se unir um nucleotídeo ao seguinte na replicação do DNA é elegante e quase enganosamente simples. Mas, como veremos, a complexidade origina-se da forma dos dispositivos enzimáticos para garantir que a informação seja transmitida intacta. Erros não corrigidos que se originam da síntese do DNA podem ter conseqüências danosas, não apenas porque podem afetar ou eliminar permanentemente a função de um gene, mas também pelo fato de a alteração ser herdável.

As enzimas que sintetizam o DNA devem copiar moléculas que contêm milhões de bases. Elas o fazem com grande fidelidade e velocidade, mesmo que o substrato DNA seja altamente compactado e ligado a outras proteínas. A formação das ligações fosfodiésteres para unir nucleotídeos ao esqueleto de uma fita crescente de DNA é, portanto, apenas uma parte de um processo elaborado que requer miríades de proteínas e enzimas.

A manutenção da integridade da informação genética coloca-se no âmago de nossa discussão sobre o reparo do DNA. Como foi detalhado no Capítulo 10, o DNA é suscetível a muitos tipos de reações lesivas. Embora essas reações ocorram raramente, elas são, entretanto, significativas por causa da tolerância biológica muito baixa às alterações na seqüência de DNA. O DNA é a única macromolécula para a qual existem sistemas de reparo; o número, a diversidade e a complexidade dos mecanismos de reparo do DNA refletem a grande variedade de ataques aos quais a molécula de DNA está sujeita.

As células freqüentemente rearranjam sua informação genética por meio de processos coletivamente chamados de recombinação —, parecendo questionar que os princípios de estabilidade e de integridade da informação genética sejam supremos. Entretanto, a maioria dos rearranjos do DNA, de fato, desempe-

Forma B do DNA

nha papéis construtivos na manutenção da integridade genômica, contribuindo de forma especial para a replicação e o reparo do DNA e para a segregação dos cromossomos.

Neste capítulo, ênfase especial é dada às enzimas do metabolismo do DNA. Elas merecem estudo cuidadoso, tanto pela sua importância crescente na medicina quanto pelo seu uso diário como reagentes em um grande número de tecnologias bioquímicas modernas. Muitas das descobertas originais do metabolismo do DNA foram feitas na *E. coli*, de forma que as suas enzimas bem conhecidas são geralmente usadas para ilustrar as regras básicas. Uma olhada rápida nos genes relevantes do mapa genético da *E. coli* (Fig. 25-1) fornece uma dica do que está por vir.

Uma Palavra sobre a Terminologia

Antes de entrarmos na replicação, devemos fazer uma pequena digressão sobre o uso de abreviaturas ao nomear genes e proteínas. Por convenção, os genes das bactérias geralmente são nomeados por três letras minúsculas itálicas que refletem sua função aparente. Por exemplo, os genes *dna*, *uvr* e *rec* afetam a replicação do *DNA*, a resistência aos efeitos lesivos da radiação *UV* e a *rec*ombinação, respectivamente. Quando vários genes afetam o mesmo processo, as letras A, B, C, e assim por diante, são adicionadas — usualmente refletindo sua ordem de descoberta em vez da sua ordem em uma seqüência de reações.

Durante as investigações genéticas, o produto gênico de cada gene é usualmente isolado e caracterizado. Muitos genes bacterianos foram identificados e nomeados antes que as funções do seu produto gênico fossem entendidas em detalhe. Algumas vezes, o produto gênico é identificado como uma proteína previamente isolada e, então, ele é renomeado. Descobriu-se, por exemplo, que o gene *dna*E codificava a subunidade polimerizante da DNA polimerase III; conseqüentemente, o gene *dna*E foi renomeado como *pol*C para refletir essa função mais claramente. Em muitos casos, o produto protéico revela-se como novo, com uma atividade não facilmente descrita por um nome enzimático. Numa prática que pode causar confusão, essas proteínas freqüen-

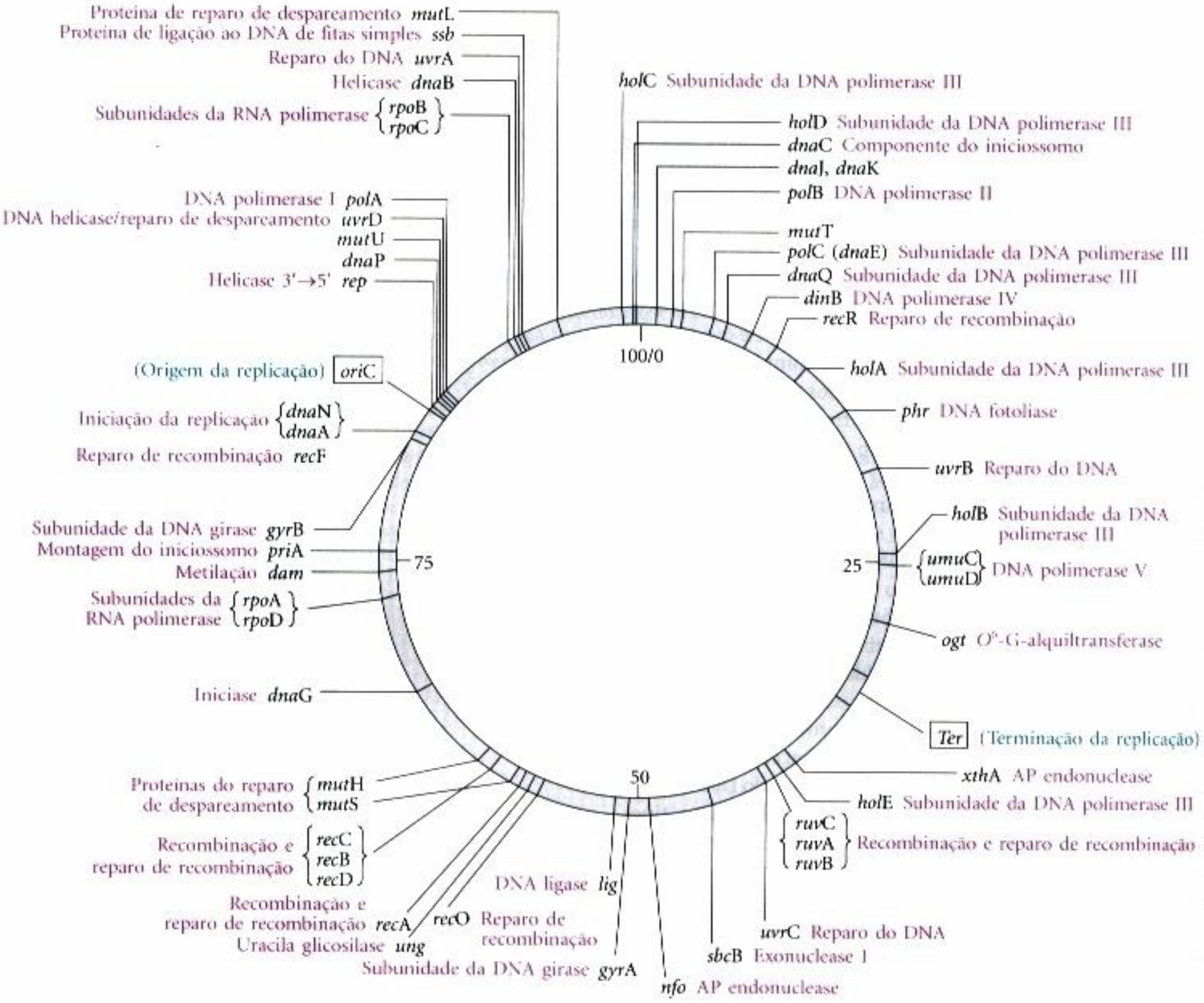

Proteína de reparo de despareamento mutL
Proteína de ligação ao DNA de fitas simples ssb
Reparo do DNA uvrA
Helicase dnaB
Subunidades da RNA polimerase rpoB rpoC
DNA polimerase I polA
DNA helicase/reparo de despareamento uvrD
mutU
dnaP
Helicase 3'→5' rep
(Origem da replicação) oriC
Iniciação da replicação dnaN dnaA
Reparo de recombinação recF
Subunidade da DNA girase gyrB
Montagem do iniciossomo priA
Metilação dam
75
Subunidades da RNA polimerase rpoA rpoD
Iniciase dnaG
Proteínas do reparo de despareamento mutH mutS
Recombinação e reparo de recombinação recC recB recD
Recombinação e reparo de recombinação recA
recO Reparo de recombinação
Uracila glicosilase ung
DNA ligase lig
Subunidade da DNA girase gyrA
nfo AP endonuclease
50
sbcB Exonuclease I
uvrC Reparo do DNA
ruvC ruvA ruvB Recombinação e reparo de recombinação
holE Subunidade da DNA polimerase III
xthA AP endonuclease
Ter (Terminação da replicação)
ogt O⁶-G-alquiltransferase
25
umuC umuD DNA polimerase V
holB Subunidade da DNA polimerase III
uvrB Reparo do DNA
phr DNA fotoliase
holA Subunidade da DNA polimerase III
100/0
recR Reparo de recombinação
dinB DNA polimerase IV
dnaQ Subunidade da DNA polimerase III
polC (dnaE) Subunidade da DNA polimerase III
mutT
polB DNA polimerase II
dnaJ, dnaK
dnaC Componente do iniciossomo
holD Subunidade da DNA polimerase III
holC Subunidade da DNA polimerase III

Figura 25-1 – Mapa do cromossomo da *E. coli*. O mapa mostra as posições relativas dos genes que codificam muitas das proteínas importantes no metabolismo do DNA. O número de genes conhecidos envolvidos fornece uma indicação da complexidade desses processos. Os números de 0 a 100 dentro do cromossomo circular denotam uma medida genética chamada de minutos. Cada minuto corresponde a cerca de 40.000 pares de bases ao longo da molécula do DNA da *E. coli*. As abreviaturas, que consistem em três letras minúsculas, geralmente refletem algum aspecto da função do gene. Elas incluem *mut*, *mut*agênese; *dna*, replicação do DNA; *pol*, DNA *pol*imerase; *rpo*, *R*NA *po*limerase; *uvr*, resistência à *UV*; *rec*, *rec*ombinação; *Ter*, *ter*minação da replicação; *ori*, *ori*gem da replicação; *dam*, metilação da adenina do *DNA*; e *lig*, DNA *lig*ase.

temente retêm o nome dos seus genes. Quando nos referimos à proteína, não devemos usar o tipo itálico e a primeira letra deve ser maiúscula: os produtos dos genes *dna*A e *rec*A são chamados de proteínas DnaA e RecA, respectivamente. Encontraremos muitos de tais exemplos neste capítulo.

Convenções semelhantes existem para nomear os genes eucarióticos, embora a forma exata das abreviações possa variar e nenhuma convenção se aplica em todos os sistemas eucarióticos.

Replicação do DNA

Muito antes de a estrutura do DNA tornar-se conhecida, cientistas admiravam a habilidade dos organismos em criar cópias fidedignas de si próprios e a habilidade das células em produzir muitas cópias idênticas de macromoléculas complexas e grandes. A especulação sobre esses problemas centrava sobre o conceito de um **molde**, uma estrutura que permitiria o alinhamento de moléculas em uma ordem específica e unidas para criar uma macromolécula com uma única seqüência e função. Os anos 1940 trouxeram a revelação de que o DNA era a molécula genética, mas, até que James Watson e Francis Crick deduzissem a sua estrutura, não estava claro como o DNA poderia atuar como um molde para a replicação e a transmissão da informação genética: *uma fita é o complemento da outra*. As regras de pareamento de bases estritas significam que cada fita fornece o molde para a fita irmã com uma seqüência complementar e previsível (veja Figs. 10-16 e 10-17).

As propriedades fundamentais do processo da replicação do DNA e os mecanismos usados pelas enzimas que o catalisam foram provados ser essencialmente idênticos em todos os organismos. Essa unidade mecanicista é um tema principal à medida que prosseguirmos das propriedades gerais do processo de replicação, para as enzimas de replicação da *E. coli* e, finalmente, para a replicação nos eucariotos.

A replicação do DNA é governada por um conjunto de regras fundamentais

A replicação do DNA é semiconservativa. Cada fita do DNA funciona como um molde para a síntese de uma nova fita, produzindo duas novas moléculas de DNA, cada uma com uma fita nova e uma fita velha. Isso é chamado de **replicação semiconservativa.**

A hipótese da replicação semiconservativa foi proposta por Watson e Crick, logo após a publicação de seu trabalho, em 1953, sobre a estrutura do DNA, e ela foi demonstrada por experimentos engenhosamente planejados por Matthew Meselson e Franklin Stahl, em 1957. Meselson e Stahl, em experimentos, cresceram células de *E. coli* por muitas gerações, em um meio onde a única fonte de nitrogênio (NH_4Cl) continha ^{15}N, o isótopo "pesado" do nitrogênio, em vez do normal, o isótopo "leve" mais abundante, ^{14}N. O DNA isolado dessas células possuía uma densidade cerca de 1% maior que a do [^{14}N]DNA normal (Fig. 25-2a). Embora isso seja apenas uma pequena diferença, uma mistura de [^{15}N]DNA pesado com [^{14}N]DNA leve pode ser separada pela centrifugação de equilíbrio em um gradiente de densidade de cloreto de césio.

As células da *E. coli* crescidas num meio ^{15}N foram transferidas para um meio fresco, contendo apenas o isótopo ^{14}N, onde elas cresciam até que a população de células tivesse dobrado. O DNA isolado dessas células de primeira geração formou uma *única* banda no gradiente de cloreto de césio, em uma posição indicadora de que os DNAs de dupla hélice das células filhas eram híbridos, contendo uma fita ^{14}N nova e uma fita ^{15}N parental (Fig. 25-2b).

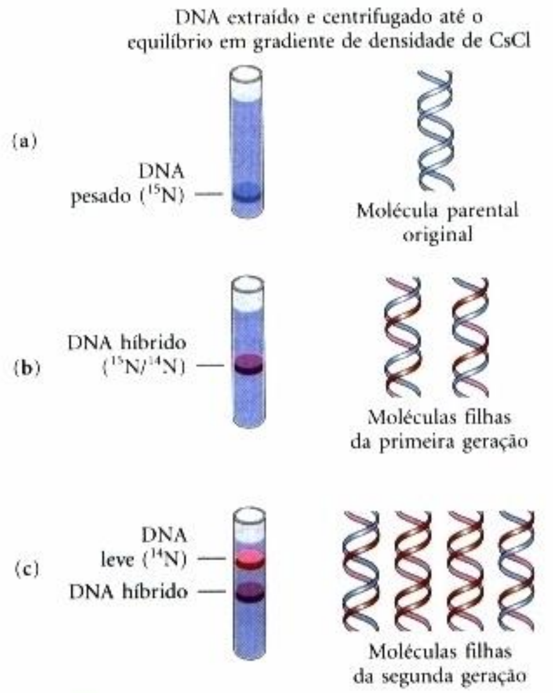

DNA extraído e centrifugado até o equilíbrio em gradiente de densidade de CsCl
(a)
DNA pesado (^{15}N)
Molécula parental original
(b)
DNA híbrido ($^{15}N/^{14}N$)
Moléculas filhas da primeira geração
(c)
DNA leve (^{14}N)
DNA híbrido
Moléculas filhas da segunda geração

Figura 25-2 – O experimento de Meselson-Stahl. (**a**) Células foram crescidas por muitas gerações em um meio que continha apenas nitrogênio pesado ^{15}N, de forma que todos os nitrogênios no DNA eram ^{15}N, como mostrado por uma banda única (azul) quando centrifugada num gradiente de CsCl. (**b**) Uma vez que as células fossem transferidas para um meio contendo apenas nitrogênio leve, ^{14}N, o DNA celular isolado depois de uma geração se equilibra numa posição mais alta no gradiente de densidade (banda púrpura). (**c**) A continuação da replicação por uma segunda geração produz dois DNAs híbridos e dois DNAs leves (vermelho), confirmando a replicação semiconservativa.

Esse resultado argumenta contra a replicação conservativa, uma hipótese alternativa, em que uma progênie da molécula de DNA consistiria de duas fitas de DNA recém-sintetizadas e a outra conteria as duas fitas parentais; isso nunca produziria moléculas de DNA híbridas no experimento de Meselson-Stahl. A hipótese da replicação semiconservativa foi também apoiada na etapa seguinte do experimento (Fig. 25-2c). Permitiu-se que as células dobrassem em número, novamente no meio ^{14}N. O produto DNA isolado desse segundo ciclo de replicação exibia *duas* bandas no gradiente de densidade, uma tendo uma densidade igual àquela do DNA leve e a outra tendo a densidade do DNA híbrido, observado depois da primeira duplicação da célula.

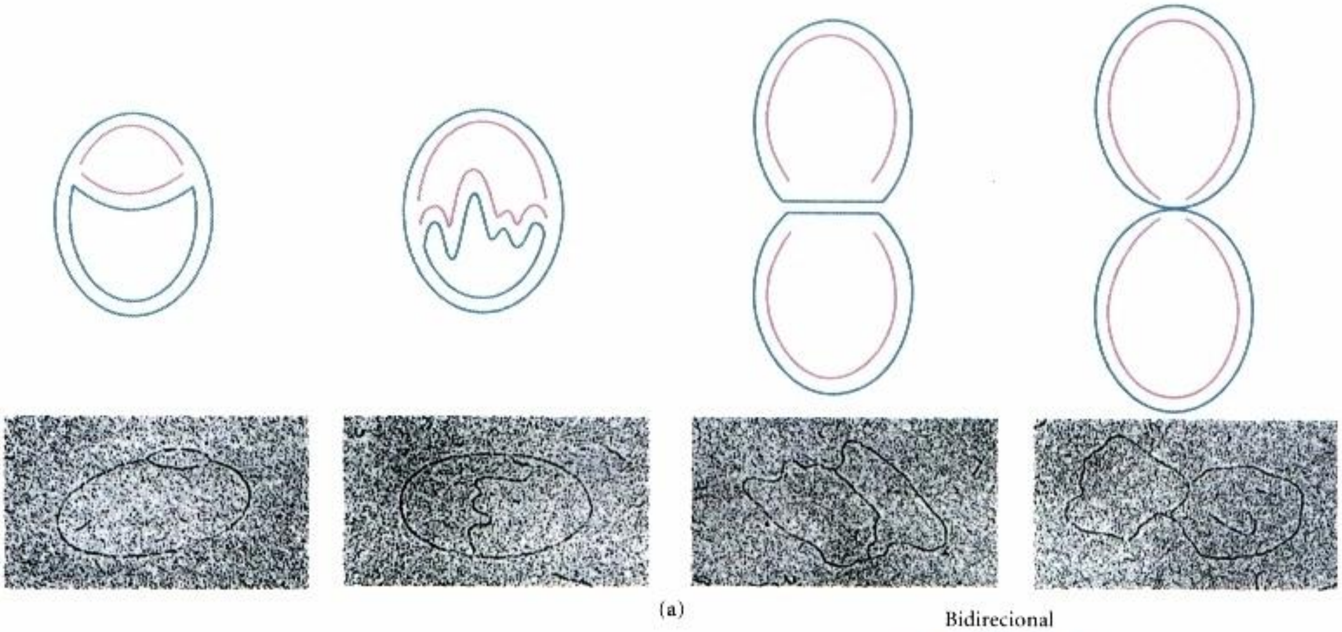
A replicação começa em uma origem e usualmente prossegue bidirecionalmente. Depois da confirmação do mecanismo semiconservativo da replicação, surge uma grande quantidade de questões. São as fitas de DNA parentais completamente desenroladas antes que cada uma se replique? A replicação começa em locais aleatórios ou em um único ponto? Depois da iniciação, em qualquer ponto do DNA, a replicação prossegue em uma direção ou em ambas?

A indicação inicial de que a replicação era um processo altamente coordenado, em que as fitas parentais eram desenroladas e replicadas simultaneamente, foi fornecida por John Cairns, usando a técnica de auto-radiografia. Ele sintetizou DNA radioativo de *E. coli*, crescendo células em um meio que continha timidina marcada com trício (^3H). Quando o DNA era cuidadosamente isolado, espalhado e coberto com uma emulsão fotográfica por várias semanas, os resíduos radioativos da timidina geravam "rastros" de grãos de prata na emulsão, produzindo uma imagem da molécula do DNA. Esses rastros revelaram que o cromossomo intacto da *E. coli* é um único círculo gigante, de 1,7mm de comprimento. O DNA radioativo isolado dessas células, durante a replicação, mostrou uma alça radioativa extra (Fig. 25-3a). Cairns concluiu que a alça no DNA resultava da formação de duas fitas filhas radioativas, cada uma complementar à fita parental. Uma ou ambas as extremidades da alça são pontos dinâmicos, chamados de **forquilhas de replicação**, onde o DNA parental está sendo desenrolado, e as fitas separadas, rapidamente replicadas. Os resultados obtidos por Cairns demonstraram que ambas as fitas do DNA são replicadas simultaneamente, e uma variação desse experimento (Fig. 25-3b) indicou que a replicação dos cromossomos bacterianos é **bidirecional**: ambas as extremidades da alça possuem forquilhas de replicação ativas.

Para determinar se as alças se originam em um único ponto do DNA, é necessário o uso de marcadores ao longo da molécula do DNA. Eles eram fornecidos por uma técnica chamada de **mapa de desnaturação**, desenvolvida por Ross Inman e colaboradores. Usando o cromossomo do bacteriófago λ de 48.502 pares de bases, Inman demonstrou que o DNA poderia ser seletivamente desnaturado em seqüências usualmente ricas em pares de bases $A{=}T$, gerando um padrão reproduzível de bolhas de fitas simples (veja Fig. 10-31). DNAs isolados, contendo alças de replicação, podem ser parcialmente desnaturados da mesma maneira. Isso permite que a posição e o progresso das forquilhas de replicação possam ser medidos e mapeados, usando as regiões desnaturadas como pontos de referência. A técnica revelou que as alças de replicação se iniciam sempre em um único ponto, chamado de **origem**. Ela também confirma uma observação anterior de que a replicação é usualmente bidirecional. Para as moléculas de DNA circulares, as duas forquilhas de replicação encontram-se em um ponto do círculo, oposto ao da origem.

A síntese do DNA prossegue na direção $5' \rightarrow 3'$ e é semidescontínua. Uma nova fita de DNA é sempre sintetizada na direção $5' \rightarrow 3'$, com a extremidade 3′ livre sendo o local onde o DNA é alongado (as extremidades 5′ e 3′ de uma fita de DNA são definidas como mostrado na Fig. 10-7). Pelo fato de as duas fitas do DNA serem antiparalelas, a fita que atua como molde está sendo lida da sua extremidade 3′ para a 5′.

Se a síntese prossegue sempre na direção $5' \rightarrow 3'$, como podem as duas fitas ser sintetizadas simultaneamente? Se ambas fossem sintetizadas *continuamente* à medida que a forquilha se move, teríamos de ter síntese na direção $3' \rightarrow 5'$. Esse problema foi resolvido por Reiji Okazaki e colaboradores, nos anos 1960. Okazaki descobriu que uma das novas fitas de DNA é sintetizada em pedaços pequenos, atualmente chamados de **fragmentos de Okazaki**. No final desse trabalho, chegou-se à conclusão de que uma fita é sintetizada continuamente e a outra descontinuamente (Fig. 25-4). A **fita líder** ou contínua é aquela em que a síntese prossegue na direção $5' \rightarrow 3'$, na *mesma* direção do movi-



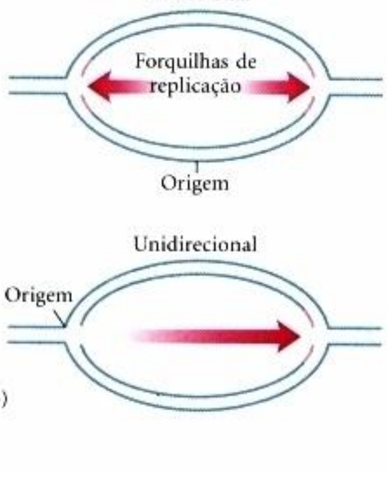


Figura 25-3 – Visualização da replicação bidirecional do DNA. A replicação de um cromossomo circular produz uma estrutura que se assemelha à letra grega teta (θ). (**a**) A marcação com trício (^{3}H) mostra que ambas as fitas são replicadas ao mesmo tempo (as fitas novas são mostradas em vermelho). As eletromicrografias ilustram a replicação de um plasmídio circular da *E. coli* visualizado pela auto-radiografia. (**b**) A adição de ^{3}H, por um curto período de tempo, antes que a reação pare, permite que a distinção seja feita entre a replicação unidirecional e a bidirecional, determinando se a marcação (em vermelho) é encontrada em uma ou em ambas as forquilhas de replicação nos auto-radiogramas. Essa técnica revelou a replicação bidirecional em *E. coli*, *B. subtilis* e outras bactérias.

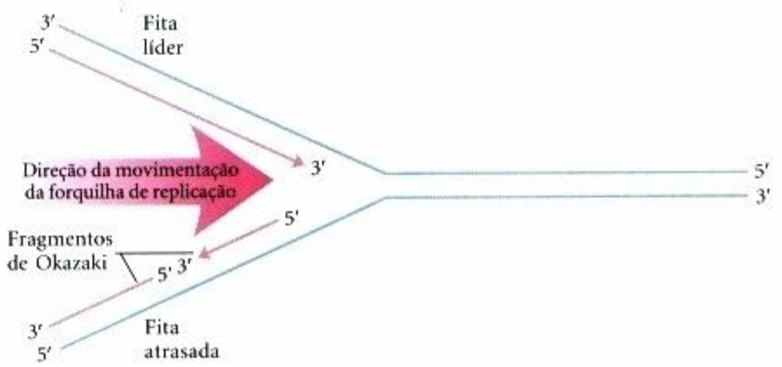


Figura 25-4 – Definição das fitas de DNA na forquilha de replicação. Uma nova fita de DNA (em vermelho) é sempre sintetizada na direção 5′→3′. O molde é lido na direção oposta: 3′→5′. A fita líder é sintetizada continuamente na direção do movimento da forquilha de replicação. A outra, a fita atrasada, é sintetizada descontinuamente em pedaços pequenos (fragmentos de Okazaki), em uma direção oposta àquela da movimentação da forquilha de replicação. Os fragmentos de Okazaki são, então, unidos pela DNA ligase. Em bactérias, os fragmentos de Okazaki possuem comprimento de aproximadamente 1.000 a 2.000 nucleotídeos. Nas células eucarióticas, eles possuem de 150 a 200 nucleotídeos de comprimento.

mento da forquilha de replicação. A fita descontínua ou **atrasada** é aquela em que a síntese 5′→3′ prossegue na direção *oposta* à direção do movimento da forquilha. Os fragmentos de Okazaki variam de comprimento, desde algumas centenas até alguns milhares de nucleotídeos, dependendo do tipo celular. Como veremos adiante, a síntese das fitas líder e atrasada é intensamente coordenada.

O DNA é degradado pelas nucleases

Para explicar a enzimologia da replicação do DNA, primeiro introduziremos as enzimas que o degradam em vez daquelas que o sintetizam. Essas enzimas são chamadas de **nucleases, ou Dnases**, se forem específicas para o DNA. Toda célula contém várias nucleases diferentes, que pertencem a duas grandes classes: exonucleases e endonucleases. As **exonucleases** degradam o ácido nucléico a partir de uma extremidade da molécula. Muitas operam apenas na direção 5′→3′ ou na direção 3′→5′, removendo nucleotídeos apenas da extremidade 5′ ou 3′, de uma fita de ácido nucléico de dupla hélice, respectivamente. As **endonucleases** podem começar a degradar em qualquer local em uma fita ou uma molécula de ácido nucléico, reduzindo-a a fragmentos cada vez menores. Algumas exonucleases e endonucleases degradam apenas fitas únicas de DNA. Há algumas classes importantes de endonucleases que clivam apenas em seqüências nucleotídicas específicas (por exemplo, as endonucleases de restrição que são tão importantes na biotecnologia; veja Capítulo 29). Você encontrará muitos tipos de nucleases neste e nos capítulos subseqüentes.

O DNA é sintetizado pela DNA polimerase

A procura de uma enzima que pudesse sintetizar DNA foi iniciada em 1955. O trabalho de Arthur Kornberg e colaboradores levou à purificação e à caracterização da DNA polimerase das células de *E. coli*, uma enzima de cadeia polipeptídica única, atualmente chamada de **DNA polimerase I** (M_r 103.000). Muito tempo depois, descobriu-se que a *E. coli* contém, pelo menos, quatro outras DNA polimerases que serão descritas a seguir.

Estudos minuciosos da DNA polimerase I revelaram características do processo de síntese do DNA, que se provaram comuns a todas as DNA polimerases. A reação fundamental é um ataque nucleofílico pelo grupo hidroxila 3′ do nucleotídeo da extremidade 3′ da fita em crescimento no fósforo α do desoxinucleosídeo 5′-trifosfato (Fig. 25-5). O pirofosfato inorgânico é liberado na reação. A equação da reação geral é:

$$\underset{\text{DNA}}{(\text{dNMP})_n} + \text{dNTP} \longrightarrow \underset{\text{DNA alongado}}{(\text{dNMP})_{n+1}} + \text{PP}_i \qquad (25\text{-}1)$$

Arthur Kornberg

onde dNMP e dNTP são os desoxinucleosídeos 5′-monofosfato e 5′-trifosfato, respectivamente. A reação apresenta um balanço termodinâmico aparente, em que uma ligação fosfodiéster é formada e outra é destruída. Entretanto, interações não-covalentes de empilhamento e de pareamento de bases ajudam a estabilizar o produto DNA alongado, relativamente ao nucleotídeo livre. A formação dos produtos também é direcionada na célula pela hidrólise subseqüente do pirofosfato pela enzima pirofosfatase.

O trabalho inicial com a DNA polimerase I levou à definição de dois requerimentos centrais para a polimerização do DNA. Primeiro, todas as DNA polimerases requerem um **molde**. A reação de polimerização é guiada por uma fita molde de DNA de acordo com as regras de pareamento de bases preditas por Watson e Crick: onde uma guanina estiver presente no molde, uma citosina é adicionada à fita nova, e assim por diante. Essa foi uma descoberta particularmente importante, não apenas porque forneceu uma base química para a replicação semiconservativa do DNA, mas porque representou o primeiro exemplo do uso de um molde orientando uma reação biossintetizante.

Segundo, um **iniciador** é requerido. Um iniciador é um segmento da fita nova (complementar ao molde) com um grupo hidroxila 3′ livre ao qual os nucleotídeos podem ser adicionados. A extremidade 3′ livre é chamada de **terminal do iniciador**. Em outras palavras, parte da nova fita já deve estar no lugar; todas as DNA polimerases podem adicionar nucleotídeos apenas a uma fita preexistente. Os iniciadores são freqüentemente oligonucleotídeos de RNA, em vez de DNA, e enzimas especializadas sintetizam os iniciadores quando e onde eles forem requeridos.

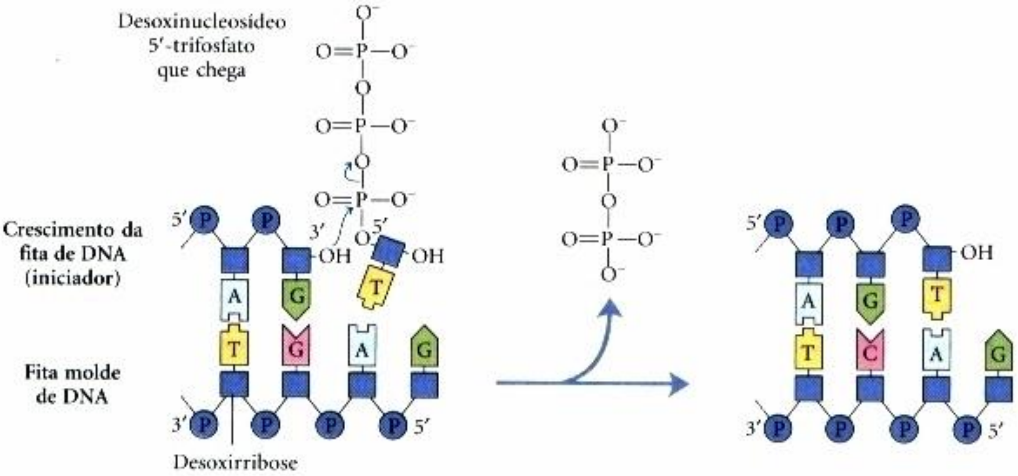


Figura 25-5 – Alongamento de uma cadeia de DNA. Uma fita única despareada é requerida para agir como molde e uma fita iniciadora é necessária para fornecer uma extremidade 3' livre, à qual novas unidades nucleotídicas serão adicionadas. Cada nucleotídeo que chega é selecionado, em parte, pelo pareamento das bases ao nucleotídeo apropriado na fita molde. O produto da reação possui uma nova extremidade 3'-OH livre, o que permite a adição de um outro nucleotídeo.

Depois que um nucleotídeo for adicionado a uma fita crescente de DNA, a DNA polimerase ou se dissocia ou se move ao longo do molde para adicionar um outro nucleotídeo. A dissociação e a reassociação da polimerase podem limitar a velocidade da polimerização — o processo é geralmente mais rápido se a polimerase adicionar nucleotídeos sem se dissociar do molde. O número médio de nucleotídeos adicionados, antes que a polimerase se dissocie definide a **processividade**. As DNA polimerases variam muito em processividade, com algumas adicionando apenas alguns nucleotídeos e outras adicionando muitos milhares antes que a dissociação ocorra.

A replicação é muito precisa

A replicação ocorre com um grau de fidelidade muito alto. Na *E. coli*, um erro é feito apenas uma vez a cada 10^9 ou 10^{10} nucleotídeos adicionados. Para o cromossomo da *E. coli*, de cerca de $4{,}6 \times 10^6$ pares de bases, isso significa que um erro será feito apenas uma vez a cada 1.000 ou 10.000 replicações. Durante a polimerização, a discriminação entre nucleotídeos corretos e incorretos depende não apenas das pontes de hidrogênio que especificam o pareamento correto entre as bases complementares, mas também da geometria comum dos pareamentos de bases padrão A=T e G≡C (Fig. 25-6). A DNA polimerase I possui um sítio ativo que acomoda apenas pares de bases com essa geometria. Um nucleotídeo incorreto pode ser capaz de fazer uma ponte de hidrogênio com uma base do molde, mas ela geralmente não se encaixará no sítio ativo. Bases incorretas serão rejeitadas antes que a ligação fosfodiéster seja formada.

A precisão da própria reação de polimerização, entretanto, é insuficiente para explicar o alto grau de fidelidade na replicação. Medidas cuidadosas, *in vitro*, têm mostrado que as DNA polimerases inserem um nucleotídeo incorreto para cada 10^4 ou 10^5 de corretos. Esses erros acontecem porque, algumas vezes, uma base fica por um curto instante em uma forma tautomérica não usual (veja Fig. 10-9), o que permite que ela forme uma ponte de hidrogênio com um parceiro incorreto. A freqüência de erro é reduzida, *in vivo*, por mecanismos enzimáticos adicionais.

Um mecanismo intrínseco a praticamente todas as DNA polimerases é uma atividade exonucleásica 3'→5' separada, que funciona como verificação dupla depois que cada nucleotídeo for adicionado. Essa atividade nucleásica permite à enzima remover um nucleotídeo recém-adicionado e é altamente específica para pares de bases despareados (Fig. 25-7). Se a polimerase adicionou o nucleotídeo errado, a translocação da enzima para a posição onde o nucleotídeo seguinte deve ser adicionado é inibida. A atividade da exonuclease 3'→5' remove o nucleotídeo despareado, e a polimerase começa novamente. Essa atividade, chamada de **revisora**, não é simplesmente o reverso da reação de polimerização (Equação 25-1), porque o pirofosfato não é envolvido. As atividades de polimerização e de revisão de uma DNA polimerase podem ser medidas separadamente. A revisão melhora a precisão inerente da reação de polimerização por 10^2 a 10^3 vezes. Na DNA polimerase I monomérica, as atividades de polimerização e de revisão possuem sítios ativos separados dentro do mesmo polipeptídeo.

As mesmas interações de pareamento de bases que orientam a polimerização são usadas para discriminar entre bases corretas e incorretas, durante a revisão. O uso de interações não-covalentes complementares, para garantir o pareamento de bases corretas em duas etapas sucessivas, é comum na síntese de moléculas que contêm a informação. Uma estratégia semelhante é usada para garantir a fidelidade da síntese de proteínas (Capítulo 27).

Quando a seleção de bases e a revisão são combinadas, a DNA polimerase deixa um erro para cada 10^6 a 10^8 bases adicionadas. A medida da precisão da replicação das células da *E. coli*, entretanto, é ainda maior. O grau adicional de precisão é fornecido por um sistema de enzimas separado, que repara pares de bases despareados que permanecem depois da replicação. Esse reparo de despareamento será descrito com outros processos de reparo do DNA, mais adiante, neste capítulo.

A *E. coli* possui pelo menos cinco DNA polimerases

Mais de 90% da atividade da DNA polimerase observada em extratos de *E. coli* deve-se à DNA polimerase I. Logo após o isolamento dessa enzima, em 1955, começava, entretanto, a se acumular evidência de que ela não seria apropriada para a replicação do grande cromossomo da *E. coli*. Primeiro, a velocidade pela qual os nucleotídeos são adicionados por essa enzima (600 nucleotídeos/min) é muito baixa, de um fator de 100 ou mais, para explicar as velocidades observadas com o movimento da

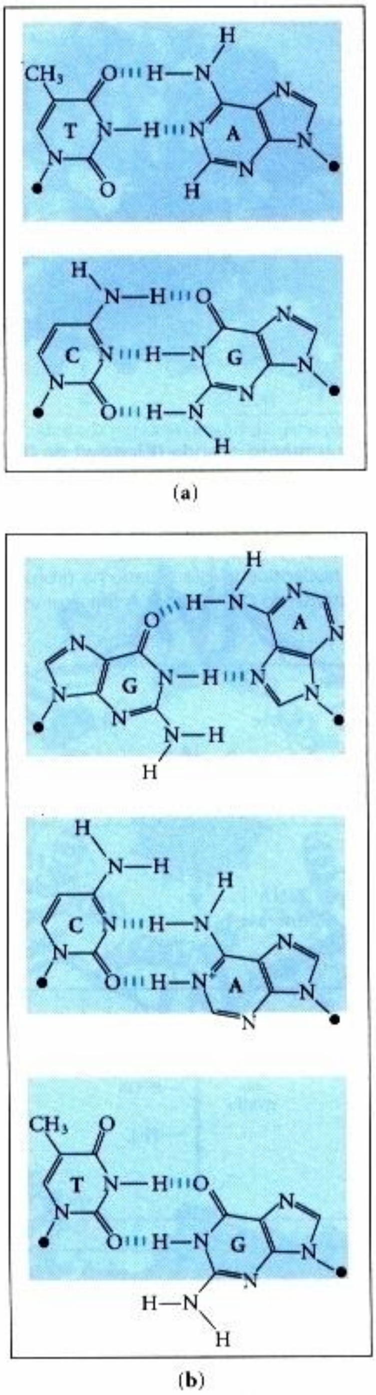

T
A
C
G
A
G
C
A
T
G
(a)
(b)

Figura 25-6 – Contribuição da geometria do par de bases para a fidelidade da replicação do DNA. (**a**) Os pares de bases padrão A=T e G≡C possuem geometrias muito semelhantes, e um sítio ativo ajustado para acomodar uma (em tom azulado) geralmente acomodará a outra. (**b**) A geometria dos pares de bases incorretos pode excluí-los do sítio ativo. A DNA polimerase I possui um centro ativo que exclui tais parceiros incorretos de pareamento.

forquilha na célula bacteriana. Segundo, a DNA polimerase I possui uma processividade relativamente baixa. Terceiro, estudos genéticos têm mostrado que muitos genes e, portanto, muitas proteínas, estão envolvidos na replicação: a DNA polimerase I, claramente, não age sozinha. Quarto, e mais importante, em 1969, John Cairns isolou uma cepa bacteriana com um gene alterado para a DNA polimerase I, que produzia uma enzima inativa. Embora essa cepa fosse anormalmente sensível a agentes que lesam o DNA, ela, entretanto, era viável!

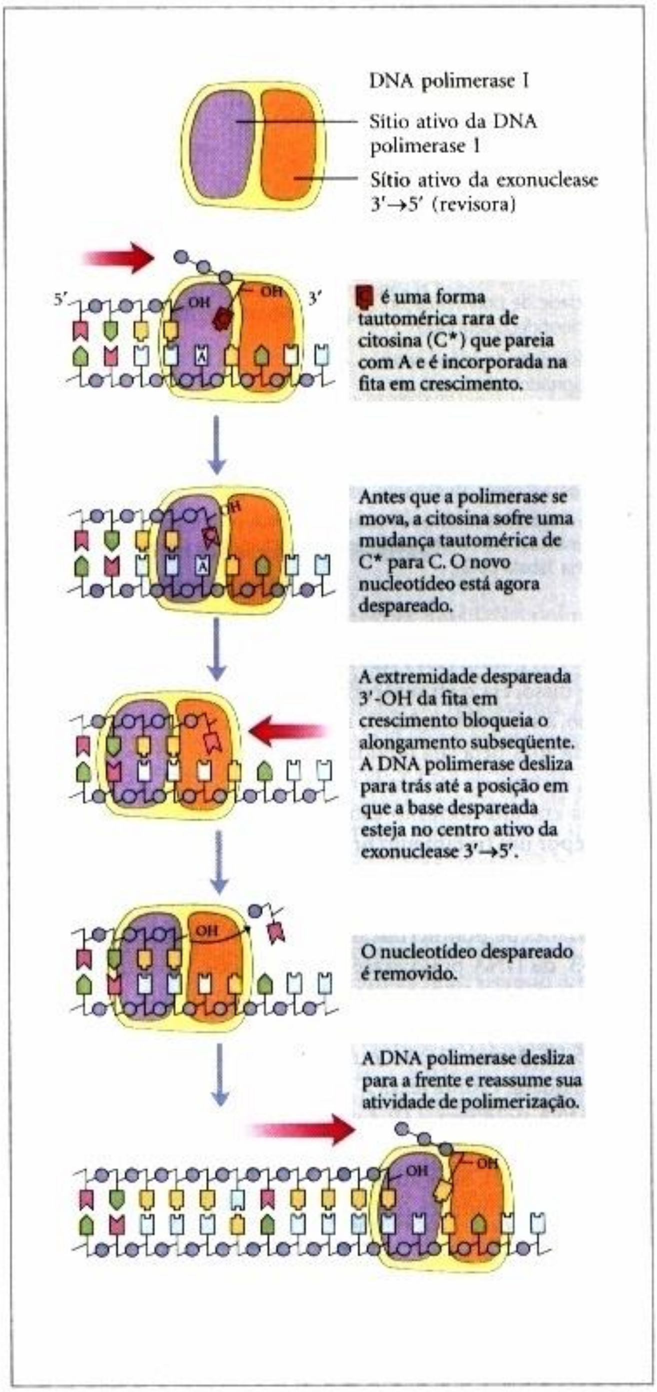

DNA polimerase I
Sítio ativo da DNA polimerase I
Sítio ativo da exonuclease 3'→5' (revisora)
5'
3'
OH
OH
é uma forma tautomérica rara de citosina (C*) que pareia com A e é incorporada na fita em crescimento.
Antes que a polimerase se mova, a citosina sofre uma mudança tautomérica de C* para C. O novo nucleotídeo está agora despareado.
A extremidade despareada 3'-OH da fita em crescimento bloqueia o alongamento subseqüente. A DNA polimerase desliza para trás até a posição em que a base despareada esteja no centro ativo da exonuclease 3'→5'.
O nucleotídeo despareado é removido.
A DNA polimerase desliza para a frente e reassume sua atividade de polimerização.

Figura 25-7 – Um exemplo de correção de erro pela atividade exonucleásica 3'→5' da DNA polimerase I. A análise estrutural tem localizado a atividade exonucleásica na frente da atividade de polimerase, à medida que a enzima é orientada no seu movimento ao longo do DNA. Uma base despareada (aqui, um despareamento C–A) impede a translocação da DNA polimerase I para o sítio seguinte. Deslizando para trás, a enzima corrige o erro com a atividade exonucleásica 3'→5' e, então, reassume a sua atividade polimerásica na direção 5'→3'.

A procura de outras DNA polimerases levou à descoberta da **DNA polimerase II** e da **DNA polimerase III**, da *E. coli*, no início dos anos 1970. A DNA polimerase II é uma enzima envolvida no reparo do DNA e será descrita mais adiante, neste capítulo. A DNA polimerase III é a principal enzima da replicação na *E. coli*. As propriedades das três DNA polimerases podem ser comparadas na Tabela 25-1. As DNA polimerases IV e V, identificadas em 1999, são envolvidas em uma forma de reparo não usual, descritas mais adiante, neste capítulo.

Tabela 25-1 – Comparação das DNA polimerases da *E. coli*

	DNA polimerase		
	I	II	III
Gene estrutural[*]	*pol*A	*pol*B	*pol*C (*dna*E)
Subunidades (número de tipos diferentes)	1	≥ 4	≥ 10
M_r	103.000	88.000[†]	830.000
Exonuclease (revisora) 3'→5'	Sim	Sim	Sim
Exonuclease 5'→3'	Sim	Não	Não
Velocidade de polimerização (nucleotídeos/segundo)	16-20	40	250-1.000
Processividade (nucleotídeos adicionados antes que a polimerase se dissocie)	3-200	1.500	≥ 500.000

[*] Para enzimas com mais de uma subunidade, o gene indicado codifica a subunidade com a atividade polimerizadora. Observe que *dna*E é uma designação anterior para o gene, atualmente, referido como *pol*C.

[†] Apenas a subunidade de polimerização. A DNA polimerase II compartilha várias subunidades com a DNA polimerase III, incluindo as subunidades β, γ, δ, δ', χ e ψ (veja Tabela 25-2).

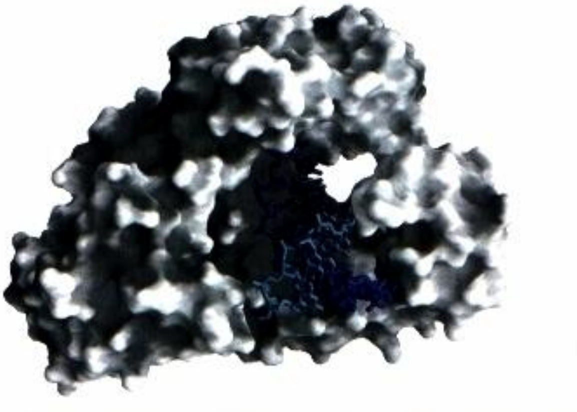


Figura 25-8 – O fragmento grande (Klenow) da DNA polimerase I. Essa polimerase é largamente distribuída nas bactérias. O fragmento Klenow, produzido por tratamento proteolítico da polimerase, retém as atividades de polimerização e de revisão da enzima. Esse fragmento Klenow é o da bactéria termofílica *Bacillus stearothermophilus*. O sítio ativo para a adição dos nucleotídeos está situado na profundidade da fenda, na extremidade distante do DNA ligado. A fita azul-escura é o molde.

A DNA polimerase I não é a principal enzima da replicação, em vez disso, ela realiza várias funções de limpeza durante a replicação, a recombinação e o reparo. Essas funções especiais são intensificadas pela sua atividade exonucleásica 5'→3'. Essa atividade, distinta da atividade revisora 3'→5' (Fig. 25-7), está localizada em um domínio estrutural que pode ser separado da enzima por um tratamento brando com protease. Quando o domínio 5'→3' é removido, o fragmento remanescente (M_r 68.000), chamado de **fragmento de Klenow** ou **grande** (Fig. 25-8), retém as atividades de polimerização e revisão. A atividade exonuclease 5'→3' da DNA polimerase I intacta pode substituir um segmento de DNA (ou RNA) pareado a uma fita molde em um processo conhecido como deslocamento de corte ("nick translation") (Fig. 25-9). A maioria das outras DNA polimerases não possui uma atividade exonucleásica 5'→3'.

A DNA polimerase III é uma enzima muito mais complexa do que a DNA polimerase I, possuindo 10 subunidades diferentes (Tabela 25-2). Suas atividades de polimerização e revisão residem nas subunidades α e ε, respectivamente. A subunidade θ se associa à α e à ε para formar o núcleo da polimerase, que pode polimerizar DNA, mas com processividade limitada. Dois núcleos da polimerase podem se ligar a um complexo por meio de um dímero de subunidades τ (tau). Esse complexo dimérico da polimerase pode se associar a um complexo único de agarrar, que consiste de seis subunidades dos cinco tipos, $\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$. Essa submontagem de 14 subunidades protéicas (de nove tipos diferentes) é chamada de DNA polimerase III*.

A DNA polimerase III* pode polimerizar o DNA, mas com uma processividade muito menor do que se esperaria para a replicação organizada de um cromossomo inteiro. O aumento necessário na processividade é fornecido pela adição de subunidades β, quatro das quais completam a DNA polimerase III holoenzima. As subunidades β se associam em pares, formando uma estrutura com forma de "doce-de-sonho" ("donut"), que circunda o DNA e age como uma braçadeira (Fig. 25-10). Cada dímero se associa a um núcleo submontado da DNA polimerase III* (uma braçadeira dimérica para cada submontagem) e desliza ao longo do DNA à medida que a replicação prossegue. A braçadeira de deslizamento β previne a dissociação da DNA polimerase III do DNA, aumentando dramaticamente a processividade para valores maiores que 500.000 (Tabela 25-1).

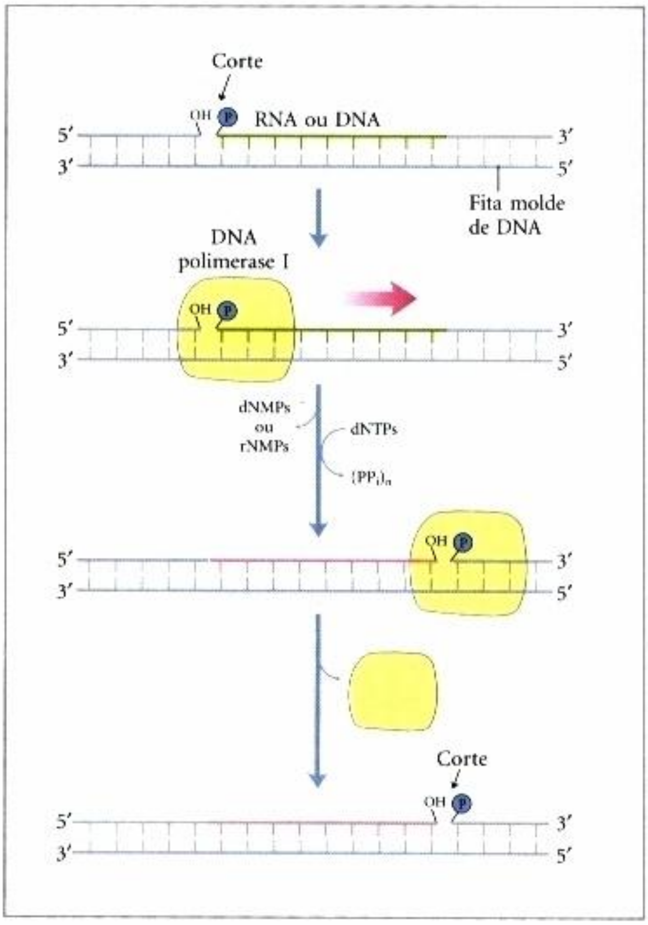


Figura 25-9 – Deslocamento do corte. Neste processo, uma fita de RNA ou DNA pareada a um DNA molde é simultaneamente degradada pela atividade exonuclease 5'→3' da DNA polimerase I e substituída pela atividade polimerásica da mesma enzima. Essas atividades possuem um papel tanto no reparo do DNA quanto na remoção dos RNAs iniciadores durante a replicação (ambos descritos adiante). A fita de ácido nucléico a ser removida (DNA ou RNA) é mostrada em verde; a fita substituta é mostrada em vermelho. Um corte (uma ligação fosfodiéster quebrada, que deixa uma 3'-OH e um fosfato 5' livres) ocorre onde a síntese do DNA deve começar. A polimerase I estende a fita não-molde do DNA e desloca o corte ao longo do DNA — processo chamado de deslocamento do corte. O corte permanece onde a DNA polimerase I se dissociar, até que seja selado por uma outra enzima.

Tabela 25-2 – Subunidades da DNA polimerase III da *E. coli*

Subunidade	Número de subunidades por holoenzima	M_r da subunidade	Gene	Função da subunidade	
α	2	132.000	*pol*C (*dna*E)	Atividade de polimerização	Núcleo da polimerase
ε	2	27.000	*dna*Q (*mut*D)	Exonuclease revisora poliamerase 3'→5'	
θ	2	10.000	*hol*E		
τ	2	71.000	*dna*X	Estabiliza a ligação ao molde; básica para a dimerização da enzima	
γ	2	52.000	*dna*X*	Complexo da braçadeira que posiciona as subunidades β na fita atrasada em cada fragmento de Okazaki	
δ	1	35.000	*hol*A		
δ'	1	33.000	*hol*B		
χ	1	15.000	*hol*C		
ψ	1	12.000	*hol*D		
β	4	37.000	*dna*N	Braçadeira de DNA requerida para a máxima processividade	

*A subunidade γ é codificada por uma porção do gene para a subunidade τ, de tal forma que 80% dos resíduos da extremidade aminoterminal da subunidade τ possuam a mesma seqüência de aminoácidos da subunidade γ. A subunidade γ é gerada por um mecanismo de deslocamento traducional (veja Adendo 28-1) que leva à terminação prematura da tradução.

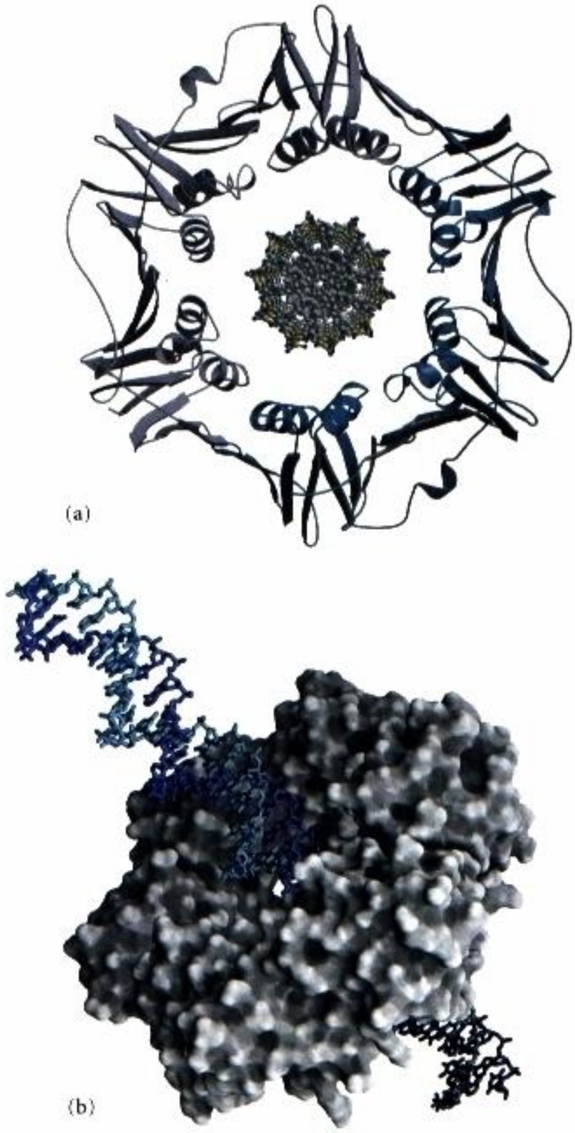


Figura 25-10 – As duas subunidades β da polimerase III da *E. coli* formam uma braçadeira circular que circunda o DNA. A braçadeira desliza ao longo do DNA, aumentando a processividade da holoenzima da DNA polimerase III para mais de 500.000, prevenindo sua dissociação. (**a**) Vista da extremidade. As duas subunidades são mostradas em estruturas de tiras cinza e azul-claro envolvendo um modelo espaço-cheio de DNA. (**b**) Vista lateral. Modelos da superfície de contorno das subunidades β (cinza) que envolvem uma representação em bastão de um DNA dupla hélice (azul-claro e azul-escuro).

A replicação do DNA requer muitas enzimas e fatores protéicos

A replicação na *E. coli* requer não apenas uma DNA polimerase, mas 20 ou mais enzimas e proteínas diferentes, cada uma desempenhando uma tarefa específica. O complexo inteiro tem sido chamado de **sistema da DNA replicase** ou **replissomo**. A complexidade enzimática da replicação reflete os constrangimentos impostos ao processo pela estrutura do DNA e os requerimentos para a precisão. As principais classes de enzimas de replicação são consideradas, aqui, em termos dos problemas que elas contornam.

O acesso para as fitas do DNA, as quais funcionarão como moldes, requer que as duas fitas parentais se separarem. Isso geralmente é realizado por enzimas chamadas de **helicases**, que se movem ao longo do DNA e separam as fitas, usando a energia química do ATP. A separação das fitas cria um estresse topológico na estrutura helicoidal do DNA (veja Fig. 24-11), que é aliviado pela ação das **topoisomerases**. As fitas separadas são estabilizadas por **proteínas de ligação ao DNA**. Antes que a DNA polimerase possa sintetizar o DNA, os iniciadores precisam estar presentes no molde — geralmente, fragmentos curtos de RNA sintetizados pelas enzimas chamadas de **iniciases**. No final, os iniciadores de RNA devem ser removidos e substituídos pelo DNA — na *E. coli*, essa é uma das muitas funções da DNA polimerase I. Depois da remoção dos segmentos de RNA e do preenchimento do vazio com DNA, permanece um corte no esqueleto do DNA, na forma de uma ligação fosfodiéster quebrada. Esses cortes são selados por enzimas chamadas de **DNA ligases**. Todos esses processos precisam ser coordenados e regulados, uma ação que tem sido mais bem caracterizada no sistema da *E. coli*.

A replicação do cromossomo da *E. coli* procede em etapas

A síntese de uma molécula de DNA pode ser dividida em três etapas: iniciação, alongamento e terminação, distinguidas tanto pelas reações realizadas como pelas enzimas requeridas. Nos próximos dois capítulos, veremos que as sínteses dos outros principais polímeros biológicos, RNAs e proteínas, também podem ser entendidas em termos de três etapas equivalentes, com as etapas de cada via possuindo características únicas. Os eventos descritos a seguir refletem a informação derivada de experimentos *in vitro*, usando proteínas purificadas da *E. coli*.

Iniciação. A origem da replicação bacteriana da *E. coli*, chamada de *ori*C, consiste de 245 pares de bases, que possuem elementos na seqüência de DNA, altamente conservados nas ori-

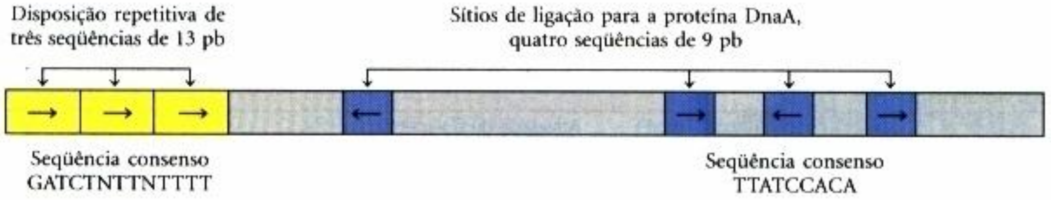


Figura 25-11 – O arranjo de seqüências na origem de replicação *oriC* da *E. coli*. Embora as seqüências repetidas (sombreadas em amarelo e azul) não sejam idênticas, certos nucleotídeos são particularmente comuns em cada posição, formando uma seqüência consenso. Nas posições onde não há consenso, N representa qualquer um dos quatro nucleotídeos. As setas indicam as orientações das seqüências de nucleotídeos.

gens das replicações bacterianas. O arranjo geral das seqüências conservadas é ilustrado na Figura 25-11. As seqüências-chave para essa discussão são duas séries de repetições curtas: três repetições de 13 pares de bases e quatro repetições de uma seqüência de 9 pares de bases.

Pelo menos, nove enzimas ou proteínas diferentes (resumidas na Tabela 25-3) participam na fase de iniciação da replicação. Elas abrem a hélice do DNA na origem e estabelecem um complexo pré-iniciação para as reações subseqüentes. O componente-chave no processo de iniciação é a proteína DnaA. Um complexo único de cerca de 20 moléculas da proteína DnaA liga-se às quatro repetições de 9 pares de bases na origem (Fig. 25-12a), reconhece e desnatura, então, sucessivamente o DNA na região das repetições de 13 pares de bases, que são ricas em pares A=T (Fig. 25-12b). Esse processo requer o ATP e a proteína bacteriana HU, semelhante à histona. A proteína DnaB, então, liga-se a essa região desenrolada, em uma reação que requer a proteína DnaC. Dois hexâmeros da proteína DnaB, cada um grudado a cada fita do DNA, agem como uma helicase, desenrolando o DNA bidirecionalmente e criando duas forquilhas de replicação potenciais. Se as proteínas de ligação ao DNA de fita simples (SSB — "single-stranded DNA-binding protein") da *E. coli* e a DNA girase (DNA topoisomerase II) forem adicionadas a essa reação *in vitro*, milhares de pares de bases serão rapidamente desenrolados pela DnaB helicase, prosseguindo a partir da origem. Muitas moléculas de SSB ligam-se cooperativamente ao DNA de fita simples, estabilizando as fitas separadas e impedindo a renaturação, enquanto a girase alivia o estresse topológico criado pela reação da DnaB helicase. O desenrolamento do DNA mediado pela proteína DnaB é acoplado à replicação, quando proteínas de replicação adicionais são incluídas, como veremos a seguir.

A iniciação é a única fase da replicação do DNA que se sabe ser regulada, mas ela é regulada de forma que a replicação ocorra apenas uma vez em cada ciclo celular. O mecanismo da regulação ainda não é bem entendido; entretanto, estudos genéticos e bioquímicos têm fornecido algumas idéias.

A regulação do tempo da iniciação da replicação é afetada pela metilação do DNA e por interações com a membrana plasmática bacteriana. A *ori*C do DNA é metilada pela Dam metilase (Tabela 25-3), que metila a posição N^6 da adenina na seqüência palindrômica (5')GATC. (Dam não é um expletivo bioquímico, mas indica a *m*etilação da *a*denina do *D*NA.) A região da *ori*C da *E. coli* é altamente enriquecida de seqüências GATC, contendo 11 delas nos seus 245 pares de bases, enquanto a freqüência média de GATC, no cromossomo da *E. coli*, é de apenas uma por cada 256 pares de bases. Imediatamente após a replicação, o DNA é semimetilado: as fitas parentais da *ori*C são metiladas, mas as fitas recém-sintetizadas não o são. As seqüências da *ori*C hemimetiladas são, então, seqüestradas, por um período de tempo, pela interação com a membrana plasmática (o mecanismo é desconhecido). Depois de certo tempo, a *ori*C é liberada da membrana plasmática e precisa ser metilada pela Dam metilase antes que ela possa novamente se ligar à DnaA e iniciar a replicação do DNA. A regulação da iniciação da replicação pode também envolver a hidrólise lenta do ATP pela proteína DnaA, que altera a proteína entre as formas ativas (ligadas ao ATP) e inativas (ligadas ao ADP).

Alongamento. A fase de alongamento da replicação inclui duas operações distintas mas relacionadas: a síntese da fita líder e a síntese da fita atrasada. Várias enzimas na forquilha de replicação são importantes para a síntese de ambas as fitas. O DNA parental é primeiro desenrolado pelas DNA helicases, e o estresse topológico resultante é aliviado pelas topoisomerases. Cada fita separada é, então, estabilizada pela SSB. A partir desse ponto, a síntese das fitas líder e atrasada é totalmente diferente.

A síntese da fita líder, a mais direta das duas, começa com a síntese de um RNA iniciador curto (de 10 a 60 nucleotídeos), pela iniciase (proteína DnaG), na origem de replicação. Desoxirribonucleotídeos são, então, adicionados a esse iniciador pela DNA polimerase III. A síntese da fita líder prossegue, então, continuamente, mantendo passo com o desenrolamento do DNA na forquilha de replicação.

Tabela 25-3 – Proteínas requeridas para iniciar a replicação na origem em *E. coli*

Proteína	M_r	Número de subunidades	Função
Proteína DnaA	52.000	1	Reconhece a seqüência da origem; abre o dúplex em locais específicos na origem
Proteína DnaB (helicase)	300.000	6*	Desenrola o DNA
Proteína DnaC	29.000	1	Requerida para a ligação da DnaB à origem
HU	19.000	2	Proteína semelhante à histona; proteína que encurva o DNA; estimula a iniciação
Iniciase (proteína DnaG)	60.000	1	Sintetiza os RNA iniciadores
SSB	75.600	4*	Liga-se às fitas simples do DNA
RNA polimerase	454.000	5	Facilita a atividade da DnaA
DNA girase (DNA topoisomerase II)	400.000	4	Alivia a torção da fita produzida pelo desenrolamento do DNA
Dam metilase	32.000	1	Metila seqüências (5')GATC na *ori*C

*As subunidades, nesse caso, são idênticas.

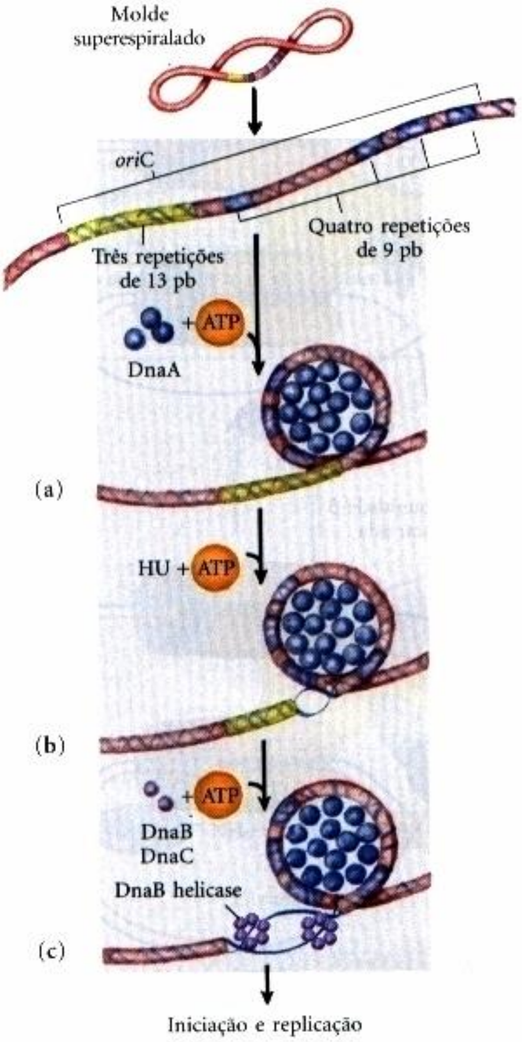

Molde
superespiralado
oriC
Três repetições
de 13 pb
Quatro repetições
de 9 pb
+ATP
DnaA
(a)
HU + ATP
(b)
+ATP
DnaB
DnaC
DnaB helicase
(c)
Iniciação e replicação

Figura 25-12 – Modelo para a iniciação da replicação na origem *oriC* da *E. coli*. (**a**) Cerca de 20 moléculas de proteínas DnaA, cada uma com um ATP ligado, ligam-se às quatro repetições de 9 pares de bases. O DNA é desenrolado ao redor desse complexo. (**b**) As três repetições de 13 pares de bases, ricas em A=T, são então desnaturadas seqüencialmente. (**c**) Hexâmeros da proteína DnaB ligam-se à cada fita com a ajuda da proteína DnaC. A atividade da DnaB helicase desenrola ainda mais o DNA, preparando a iniciação e a síntese do DNA.

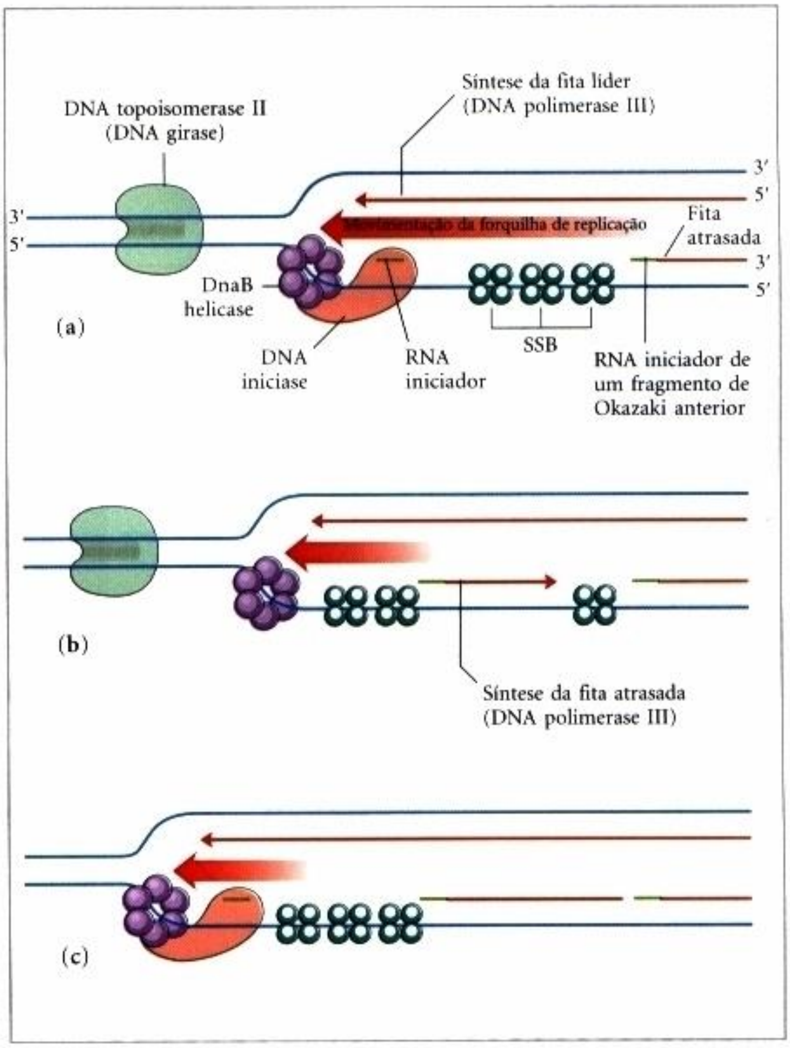

DNA topoisomerase II
(DNA girase)
Síntese da fita líder
(DNA polimerase III)
3′
5′
3′
5′
Movimentação da forquilha de replicação
Fita
atrasada
3′
5′
DnaB
helicase
(a)
DNA
iniciase
RNA
iniciador
SSB
RNA iniciador de
um fragmento de
Okazaki anterior
(b)
Síntese da fita atrasada
(DNA polimerase III)
(c)

Figura 25-13 – Síntese dos fragmentos de Okazaki. (**a**) A intervalos, a iniciase sintetiza um RNA iniciador para um novo fragmento de Okazaki. Observe que, se considerarmos as duas fitas moldes colocadas lado a lado, a síntese da fita atrasada formalmente prossegue na direção oposta ao movimento da forquilha. (**b**) Cada iniciador é estendido pela DNA polimerase III. (**c**) A síntese do DNA continua até que o fragmento se estenda até o iniciador do fragmento de Okazaki, previamente adicionado. Um novo iniciador é sintetizado próximo à forquilha de replicação para começar o processo novamente.

A síntese da fita atrasada, como apontamos, é realizada em curtos fragmentos de Okazaki. Primeiro, um RNA iniciador é sintetizado pela iniciase e, assim como na fita líder, a DNA polimerase III se liga ao RNA iniciador e adiciona nucleotídeos (Fig. 25-13). Nesse nível, a síntese de cada fragmento de Okazaki parece direta, mas, na realidade, é bem complexa. A complexidade está na *coordenação* da síntese da fita líder com a atrasada: ambas as fitas são produzidas por um *único* dímero assimétrico da DNA polimerase III. Isso é conseguido, fazendo uma alça do DNA da fita atrasada, como mostrado na Figura 25-14, aproximando os dois pontos de polimerização.

A síntese dos fragmento de Okazaki, na fita atrasada, obriga a uma coreografia enzimática elegante. A DnaB helicase e a DnaG iniciase constituem uma unidade funcional no complexo de replicação, chamado de **iniciossomo.** A DNA polimerase III usa um conjunto das subunidades do seu núcleo (o **núcleo da polimerase**) para sintetizar continuamente a fita líder, enquanto o outro conjunto de subunidades do núcleo oscila de um fragmento de Okazaki para o próximo na alça da fita atrasada. À medida que o DNA é desenrolado pela DnaB helicase na forquilha da replicação (Fig. 25-14a), a DNA iniciase ocasionalmente se associa à DnaB helicase e sintetiza um RNA iniciador curto (Fig. 25-14b). Uma nova braçadeira de deslizamento β é então posicionada no iniciador pelo complexo de carga da braçadeira da DNA polimerase III (Fig. 25-14c). Quando a síntese de um fragmento de Okazaki for completada, a replicação pára e as subunidades do núcleo da DNA polimerase III se dissociam da sua braçadeira de deslizamento β (e o fragmento de Okazaki completado) e se associam com o novo (Fig. 25-14d). Isso inicia a síntese de um novo fragmento de Okazaki. A evidência se acumula de que o complexo, com tudo isso ocorrendo no seu interior, não se movimenta. Em vez disso, ele se associa à membrana plasmática e o DNA se move através do complexo fixo.

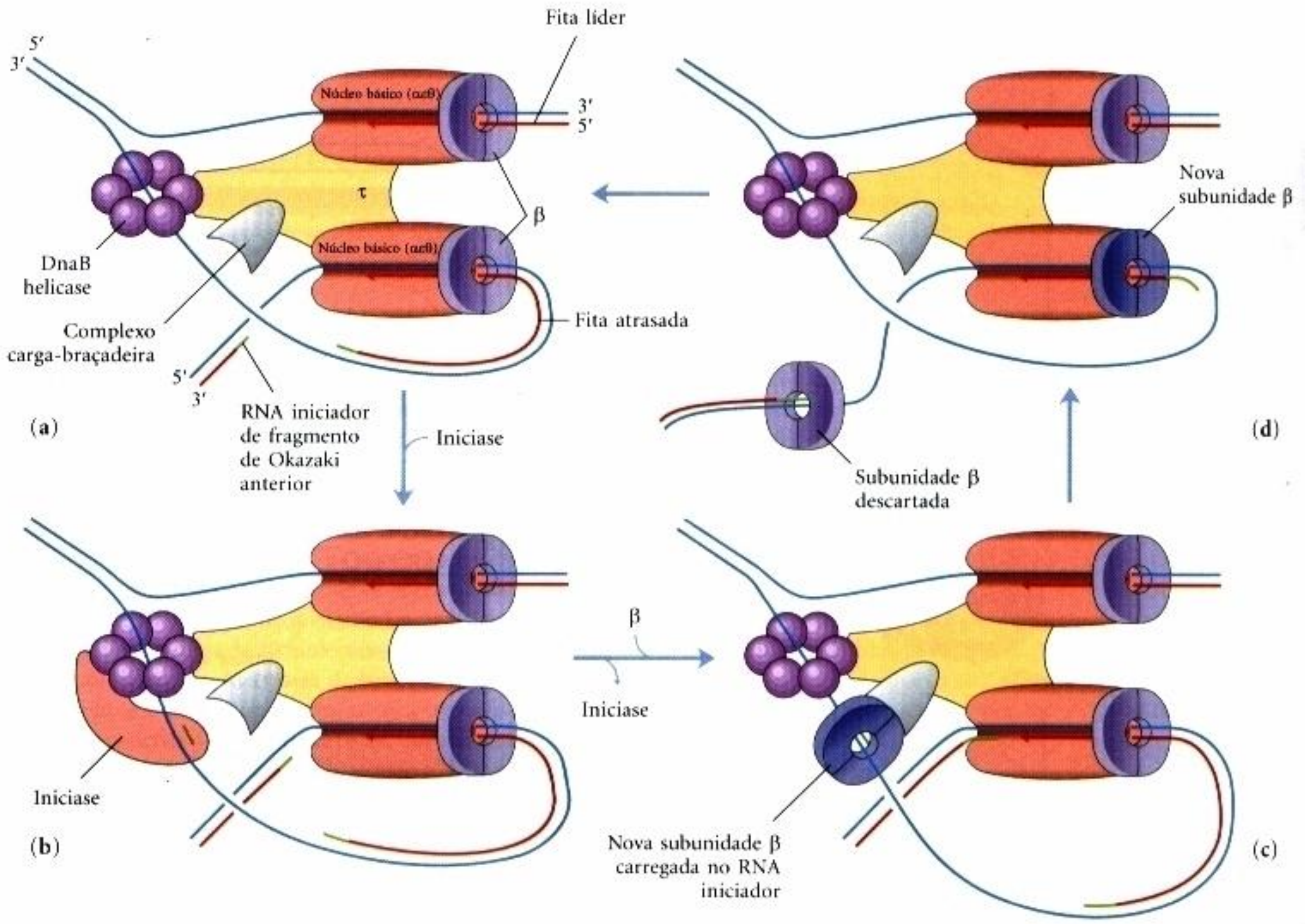

Fita líder
5'
3'
Núcleo básico (αεθ)
3'
5'
τ
β
Núcleo básico (αεθ)
DnaB helicase
Complexo carga-braçadeira
Fita atrasada
5'
3'
RNA iniciador de fragmento de Okazaki anterior
(a)
Iniciase
Nova subunidade β
(d)
Subunidade β descartada
β
Iniciase
Iniciase
(b)
Nova subunidade β carregada no RNA iniciador
(c)

Figura 25-14 – A síntese do DNA nas fitas líder e atrasada. Os eventos na forquilha de replicação são coordenados por um único dímero da DNA polimerase III, em um complexo integrado com a DnaB helicase. Esta figura mostra o processo de replicação já em andamento. A fita atrasada fez uma alça de tal forma que a síntese do DNA prossegue firmemente em ambas as fitas líder e atrasada ao mesmo tempo, catalisada por dois conjuntos de subunidades do núcleo da DNA polimerase III. As setas indicam as extremidades 3' das duas novas fitas e a direção da síntese do DNA. Um fragmento de Okazaki está sendo sintetizado na fita atrasada. (**a**) A síntese contínua na fita líder prossegue à medida que o DNA é desenrolado pela DnaB helicase. (**b**) A DNA iniciase se liga à DnaB e sintetiza um novo iniciador, depois se dissocia. (**c**) O complexo de carga da braçadeira catalisa o carregamento de uma braçadeira de deslizamento β (azul-escuro) ao novo RNA iniciador. Enquanto isso, o fragmento de Okazaki que foi sintetizado é completado. (**d**) As subunidades do núcleo da DNA polimerase III que sintetizaram a fita atrasada soltam tanto o fragmento de Okazaki completado quanto a braçadeira de deslizamento β, usada na sua síntese. (O complexo de carga da braçadeira provavelmente facilita a reciclagem das braçadeiras de deslizamento β (não mostrado).) As mesmas subunidades do núcleo, então, ligam-se à nova braçadeira de deslizamento β e começam a sintetizar um outro fragmento de Okazaki no seu iniciador.

O processo permite a síntese rápida, com cerca de 1.000 nucleotídeos de novo DNA adicionados por segundo em cada fita (líder e atrasada). Assim que um fragmento de Okazaki for completado, seu RNA iniciador é removido e substituído por DNA pela DNA polimerase I e o corte remanescente é selado pela DNA ligase (Fig. 25-15). As proteínas que agem na forquilha de replicação estão resumidas na Tabela 25-4.

A DNA ligase catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre a hidroxila 3' da extremidade de uma fita de DNA e um fosfato 5' na outra extremidade da fita. O fosfato deve ser ativado por adenilação. DNA ligases isoladas de vírus e eucariotos usam ATP para esse propósito. DNA ligases de bactérias não são usuais, porque, geralmente, usam o NAD$^+$ — um co-fator que normalmente funciona nas reações de transferências de hidretos (veja Fig. 14-15) — como fonte do grupo de ativação do AMP (Fig. 25-16). A DNA ligase é uma outra enzima do metabolismo do DNA que tem se tornado um importante reagente nos experimentos de DNA recombinante (Capítulo 29).

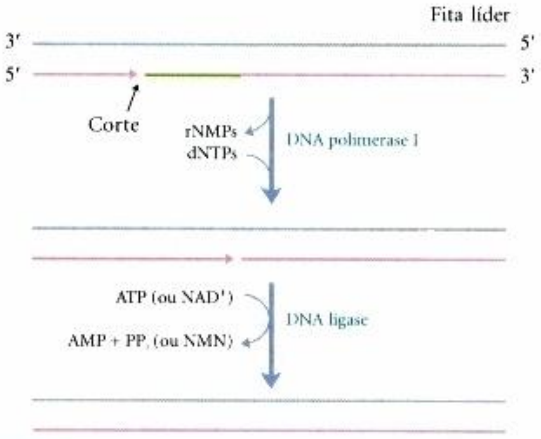
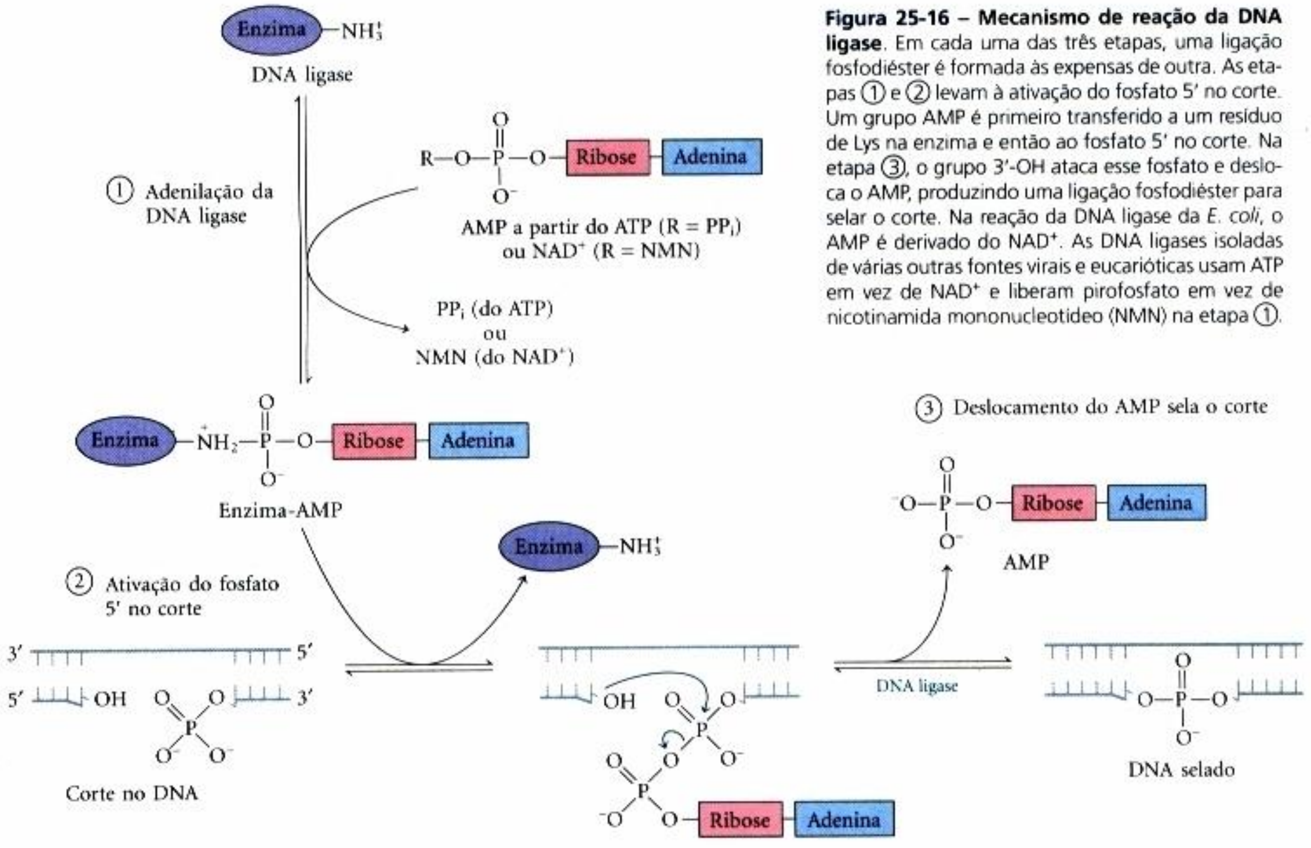

Fita líder
3'
5'
5'
3'
Corte
rNMPs
dNTPs
DNA polimerase I
ATP (ou NAD⁺)
AMP + PP$_i$ (ou NMN)
DNA ligase

Figura 25-15 – Os RNA iniciadores na fita atrasada são removidos pela atividade exonucleásica 5'→3' da DNA polimerase I e substituídos por DNA pela mesma enzima. O corte remanescente é selado pela DNA ligase. O papel do ATP ou NAD$^+$ é mostrado na Figura 25-16.

Tabela 25-4 – Proteínas na forquilha de replicação da *E. coli*

Proteína	M_r	Número de subunidades	Função
SSB	75.600	4	Liga-se às fitas simples do DNA
Proteína DnaB (helicase)	300.000	6	Desenrola o DNA; constituinte do iniciossomo
Iniciase (proteína DnaG)	60.000	1	Sintetiza o RNA iniciador; constituinte do iniciossomo
DNA polimerase III	900.000	18-20	Alongamento da nova fita
DNA polimerase I	103.000	1	Preenchimento dos vazios; excisão dos iniciadores
DNA ligase	74.000	1	Ligação
DNA girase (DNA topoisomerase II)	400.000	4	Superespiralamento

Modificado de Kornberg A. (1982) *Supplement to DNA Replication*, Tabela S11-2, WH Freeman and Company, New York.



Enzima
$-NH_3^+$
DNA ligase
① Adenilação da DNA ligase
R—O—P—O—Ribose—Adenina
AMP a partir do ATP (R = PPᵢ) ou NAD⁺ (R = NMN)
PPᵢ (do ATP) ou NMN (do NAD⁺)
Enzima-AMP
② Ativação do fosfato 5' no corte
3'
5'
OH
Corte no DNA
Ribose
Adenina
③ Deslocamento do AMP sela o corte
AMP
DNA ligase
DNA selado

Figura 25-16 – Mecanismo de reação da DNA ligase. Em cada uma das três etapas, uma ligação fosfodiéster é formada às expensas de outra. As etapas ① e ② levam à ativação do fosfato 5' no corte. Um grupo AMP é primeiro transferido a um resíduo de Lys na enzima e então ao fosfato 5' no corte. Na etapa ③, o grupo 3'-OH ataca esse fosfato e desloca o AMP, produzindo uma ligação fosfodiéster para selar o corte. Na reação da DNA ligase da *E. coli*, o AMP é derivado do NAD⁺. As DNA ligases isoladas de várias outras fontes virais e eucarióticas usam ATP em vez de NAD⁺ e liberam pirofosfato em vez de nicotinamida mononucleotídeo (NMN) na etapa ①.

Terminação. Finalmente, as duas forquilhas de replicação do cromossomo circular da *E. coli* encontram-se em uma região terminal que contém cópias múltiplas de uma seqüência de 20 pares de bases, chamada de *Ter* (de *ter*minação) (Fig. 25-17a). As seqüências *Ter* estão arranjadas no cromossomo para criar uma espécie de armadilha na qual uma forquilha de replicação pode entrar, mas não sair. As seqüências *Ter* funcionam como sítio de ligação para uma proteína chamada Tus ("*t*erminus *u*tilization *s*ubstance"). O complexo Tus-*Ter* pode parar uma forquilha de replicação apenas em uma direção. Apenas um complexo Tus-*Ter* funciona em cada ciclo de replicação — aquele primeiro encontrado por qualquer uma das forquilhas de replicação. Considerando que as forquilhas de replicação geralmente param quando se colidem, as seqüências *Ter* não parecem ser essenciais, mas podem prevenir uma nova replicação por uma das forquilhas de replicação, quando a outra estiver atrasada ou parada por ter encontrado uma lesão do DNA ou algum outro obstáculo.

Quando qualquer uma das forquilhas de replicação encontra um complexo funcional Tus-*Ter*, ela pára; a outra forquilha pára quando ela encontra a primeira forquilha (já parada). As últimas poucas centenas de pares de bases do DNA, entre esses grandes complexos protéicos, são então replicadas (por um mecanismo ainda não entendido), completando os dois cromossomos circulares topologicamente interligados (catenados) (Fig. 25-17b). Círculos de DNA ligados dessa forma são chamados de **catenanos**. A separação dos círculos catenados na *E. coli* requer a topoisomerase IV (um tipo da topoisomerase II). Os cromossomos separados são, então, segregados para as células filhas durante a divisão celular. A fase terminal da replicação de outros cromossomos circulares, incluindo muitos DNAs virais de eucariotos, é semelhante.

A replicação nas células eucarióticas é mais complexa

As moléculas de DNA nas células eucarióticas são consideravelmente maiores que aquelas das bactérias e são organizadas em estruturas nucleoprotéicas complexas (cromatina; veja Capítu-

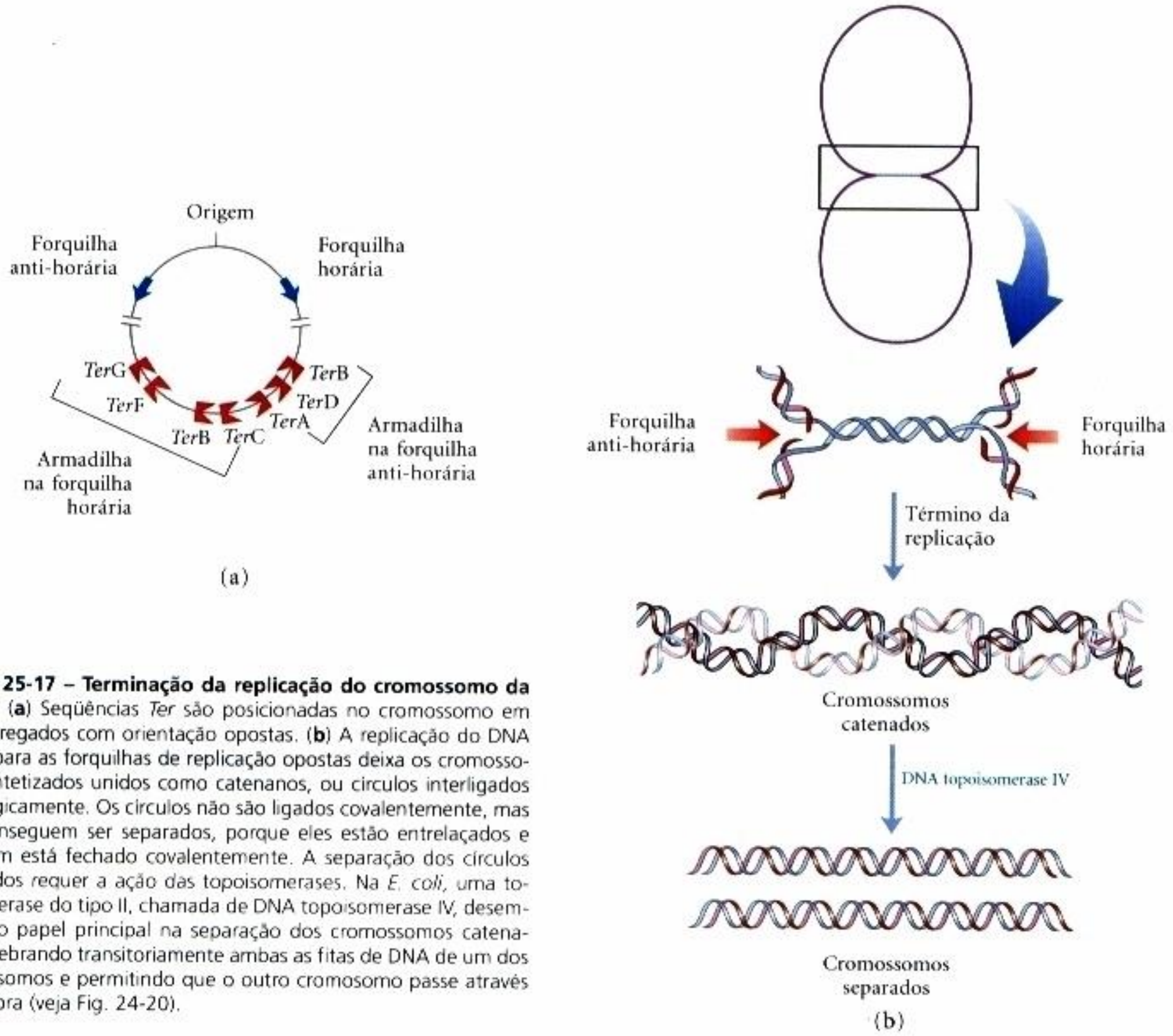


Figura 25-17 – Terminação da replicação do cromossomo da *E. coli*. (**a**) Seqüências *Ter* são posicionadas no cromossomo em dois agregados com orientação opostas. (**b**) A replicação do DNA que separa as forquilhas de replicação opostas deixa os cromossomos sintetizados unidos como catenanos, ou círculos interligados topologicamente. Os círculos não são ligados covalentemente, mas não conseguem ser separados, porque eles estão entrelaçados e cada um está fechado covalentemente. A separação dos círculos catenados requer a ação das topoisomerases. Na *E. coli*, uma topoisomerase do tipo II, chamada de DNA topoisomerase IV, desempenha o papel principal na separação dos cromossomos catenados, quebrando transitoriamente ambas as fitas de DNA de um dos cromossomos e permitindo que o outro cromosomo passe através da quebra (veja Fig. 24-20).

lo 24). As características essenciais da replicação do DNA são as mesmas nos eucariotos e nos procariotos. Entretanto, algumas variações interessantes, nos princípios gerais discutidos anteriormente, prometem novas idéias na regulação da replicação e em sua ligação com o ciclo celular.

As origens da replicação, chamadas de seqüências de replicação autônomas (ARS — "*a*utonomously *r*eplicating *s*equences"), ou **replicadores**, foram identificadas e mais bem estudadas na levedura. Os replicadores da levedura se estendem por 150 pares de bases e contêm várias seqüências conservadas. Cerca de 400 replicadores estão distribuídos entre os 17 cromossomos em um genoma de levedura haplóide. A iniciação da replicação em todos os eucariotos requer uma proteína com muitas subunidades, o complexo de reconhecimento da origem (ORC — "*o*rigin *r*ecognition *c*omplex"), que se liga a várias seqüências dentro do replicador. A ORC interage e é regulada por várias outras proteínas envolvidas no controle do ciclo celular eucariótico.

A velocidade do movimento da forquilha de replicação nos eucariotos (~50 nucleotídeos/segundo) é apenas $^1/_{20}$ daquela observada na *E. coli*. Nessa velocidade, a replicação de um cromossomo humano médio, partindo de uma única origem, levaria cerca de 500 horas. Na realidade, a replicação dos cromossomos humanos prossegue bidirecionalmente a partir de pontos de origens múltiplos, espaçados de 30.000 a 300.000 pares de bases. Os cromossomos eucarióticos são quase sempre muito maiores do que os cromossomos bacterianos, de tal forma que as origens múltiplas são provavelmente uma característica geral das células eucarióticas.

Como nas bactérias, os eucariotos possuem vários tipos de DNA polimerases. Algumas têm sido ligadas a funções especiais, como a replicacão do DNA mitocondrial. A replicação dos cromossomos nucleares envolve a DNA polimerase α, em associação à DNA polimerase δ. A **DNA polimerase α** é tipicamente uma enzima com subunidades múltiplas com estruturas características semelhantes em todas as células eucarióticas. Uma das subunidades possui uma atividade iniciadora, e a subunidade maior (M_r ~180.000) contém a atividade polimerásica. Entretanto, essa polimerase não possui a atividade exonucleásica de revisão 3′→5′, tornando-a inadequada para a replicação de DNA de alta fidelidade. Acredita-se que a DNA polimerase α funcione apenas na síntese de iniciadores curtos (contendo tanto RNA quanto DNA) dos fragmentos de Okazaki na fita atrasada. Esses iniciadores são, então, estendidos pelas subunidades da **DNA polimerase δ**. Essa enzima é associada e estimulada por uma proteína chamada de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA — "*p*roliferating *c*ell *n*uclear *a*ntigen"; M_r 29.000), que é encontrada em grandes quantidades no núcleo das células proliferantes. A PCNA possui uma estrutura e função análoga àquela da subunidade β da DNA polimerase III da *E. coli* (Fig. 25-10), formando uma braçadeira circular que aumenta muito a processividade da polimerase. A DNA polimerase δ possui uma atividade exonucleásica de revisão 3'→5'e parece realizar a síntese da fita líder e da fita atrasada em um complexo análogo àquele do dímero bacteriano da DNA polimerase III.

Uma outra polimerase, a **DNA polimerase ε**, substitui a DNA polimerase δ em algumas situações, tal como no reparo do DNA. A DNA polimerase ε pode também funcionar na forquilha de replicação, talvez desempenhando um papel análogo àquele da DNA polimerase I bacteriana, removendo os iniciadores dos fragmentos de Okazaki na fita atrasada.

Dois outros complexos protéicos também funcionam na replicação do DNA eucariótico. A RPA é uma proteína eucariótica de ligação ao DNA de fita simples de função equivalente à da proteína SSB da *E. coli*. A RFC é um carregador da braçadeira (ou "empresário") para a PCNA e facilita a montagem dos complexos ativos de replicação.

A terminação da replicação nos cromossomos eucarióticos lineares envolve a síntese de estruturas especiais chamadas de **telômeros**, nas extremidades do cromossomo, como discutiremos no próximo capítulo.

Reparo do DNA

Uma célula geralmente possui apenas um ou dois conjuntos de DNA genômico. Moléculas de proteínas e RNA lesadas podem ser rapidamente substituídas, usando a informação codificada no DNA, mas as próprias móleculas do DNA são insubstituíveis. Manter a integridade da informação contida no DNA é, portanto, um imperativo celular apoiado por um elaborado conjunto de sistemas de reparo do DNA. O DNA pode tornar-se lesado por uma variedade de processos, alguns espontâneos, outros catalisados por agentes ambientais (Capítulo 10). A própria replicação pode ocasionalmente lesar o conteúdo informacional do DNA ao deixar bases despareadas.

A química da lesão do DNA é diversa e complexa. A resposta celular a essa lesão inclui uma grande variedade de sistemas enzimáticos que catalisam algumas das mais importantes transformações químicas no metabolismo do DNA. Examinaremos primeiro os efeitos das alterações na seqüência de DNA e, então, voltaremos aos sistemas de reparos específicos.

As mutações são ligadas ao câncer

A melhor maneira de ilustrar a importância do reparo do DNA é considerar os efeitos da lesão *não-reparada* do DNA (uma lesão). A conseqüência mais séria é uma alteração na seqüência de bases do DNA, que, se replicada e transmitida às futuras gerações celulares, se torna permanente. Uma alteração permanente na seqüência nucleotídica do DNA é chamada de **mutação**. As mutações podem envolver a substituição de um par de base por outro (mutação por substituição), a adição ou a deleção de um ou mais pares de bases (mutações por inserção ou deleção). Se a mutação afetar um DNA não-essencial ou se tiver um efeito negligenciável na função de um gene, ela é chamada de uma **mutação silenciosa**. Raramente, uma mutação confere alguma vantagem biológica. A maioria das mutações, entretanto, é deletéria.

Nos mamíferos, há uma forte correlação entre o acúmulo das mutações e o câncer. Um teste simples, desenvolvido por Bruce Ames, mede o potencial de um certo composto químico em promover certas mutações facilmente detectáveis em uma cepa bacteriana especializada (Fig. 25-18). Poucos dos compostos químicos que encontramos no dia-a-dia aparecem como mutagênicos nesse teste. Entretanto, os compostos conhecidos como carcinogênicos em ensaios animais extensivos, mais de 90% deles, são também encontrados como mutagênicos no teste de Ames. Por causa da forte correlação entre a mutagênese e a carcinogênese, o teste de Ames para mutagênicos bacterianos é largamente usado como triagem rápida e barata para identificar potenciais carcinogênicos.

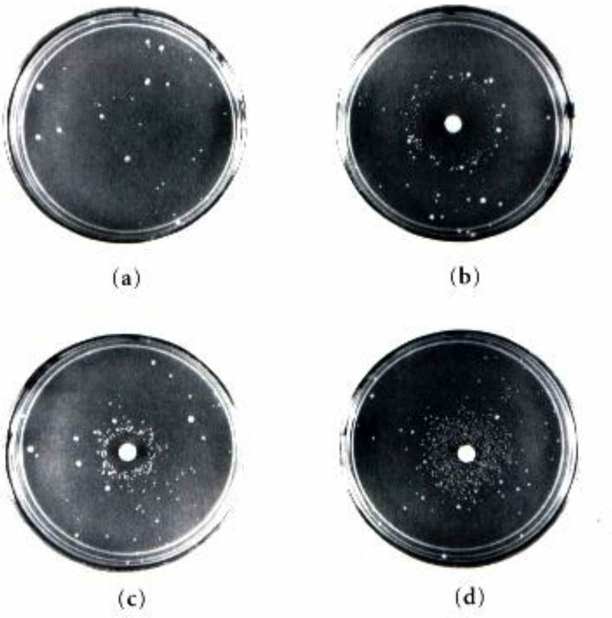


Figura 25-18 – O teste de Ames para carcinogênicos, baseado na sua mutagenicidade. Uma cepa da *Salmonella typhimurium*, que possui uma mutação que inativa uma enzima da via biossintetizante da histidina, é plaqueada em um meio livre de histidina. Poucas células crescem. (**a**) As poucas colônias pequenas da *S. typhimurium*, que cresceram no meio livre de histidina, carregam retromutações espontâneas que permitem que a via biossintetizante da histidina opere. Três placas idênticas de nutriente, (**b**), (**c**) e (**d**), foram inoculadas com um número idêntico de células. Cada placa recebeu, então, um disco de papel-filtro, contendo concentrações progressivamente menores de um mutagênico. O mutagênico aumenta muito a freqüência de retromutações e, portanto, o número de colônias. As áreas claras ao redor do papel-filtro indicam que a concentração do mutagênico é tão alta que ele é letal para as células. À medida que o mutagênico se difunde a partir do papel-filtro, ele é diluído a concentrações subletais que promovem a retromutação. Os mutagênicos podem ser comparados tendo como base o aumento da freqüência de mutação que produzem. Pelo fato de muitos compostos sofrerem uma variedade de transformações químicas, quando entram em uma célula, os compostos são, algumas vezes, testados para mutagenicidade depois de incubados com um extrato de fígado. Muitos compostos foram detectados como mutagênicos apenas depois desse tratamento.

O genoma de uma célula típica de mamífero acumula muitos milhares de lesões em um período de 24 horas. Entretanto, graças ao reparo do DNA, menos de uma lesão em 1.000 torna-se uma mutação. O DNA é uma molécula relativamente estável, mas, sem os sistemas de reparo, o efeito cumulativo de muitas reações infreqüentes, mas lesivas, tornariam a vida impossível.

Todas as células possuem múltiplos sistemas de reparo do DNA

O número e a diversidade dos sistemas de reparo refletem tanto a importância do reparo do DNA para a sobrevivência da célula quanto as diversas fontes de lesão do DNA (Tabela 25-5). Alguns tipos de lesões comuns, tais como os dímeros de pirimidina (veja Fig. 10-34), podem ser reparados por meio de vários sistemas distintos. Muitos processos de reparo do DNA parecem

Tabela 25-5 – Tipos de sistemas de reparo do DNA na *E. coli*

Enzimas/proteínas	Tipo de lesão
Reparo de despareamento	
Dam metilase	Despareamento
Proteínas MutH, MutL, MutS	
DNA helicase II	
SSB	
DNA polimerase III	
Exonuclease I	
Exonuclease VII	
Nuclease RecJ	
Exonuclease X	
DNA ligase	
Reparo de excisão de base	
DNA glicosilases	Bases anormais (uracila, hipoxantina, xantina); bases alquiladas; dímeros de pirimidina em alguns outros organismos
AP endonucleases	
DNA polimerase I	
DNA ligase	
Reparo de excisão de nucleotídeos	
Excinuclease ABC	Lesões de DNA que causam grandes alterações estruturais (por exemplo, dímeros de pirimidina)
DNA polimerase I	
DNA ligase	
Reparo direto	
DNA fotoliases	Dímeros de pirimidina
O^6-metilguanina-DNA metiltransferase	O^6-metilguanina

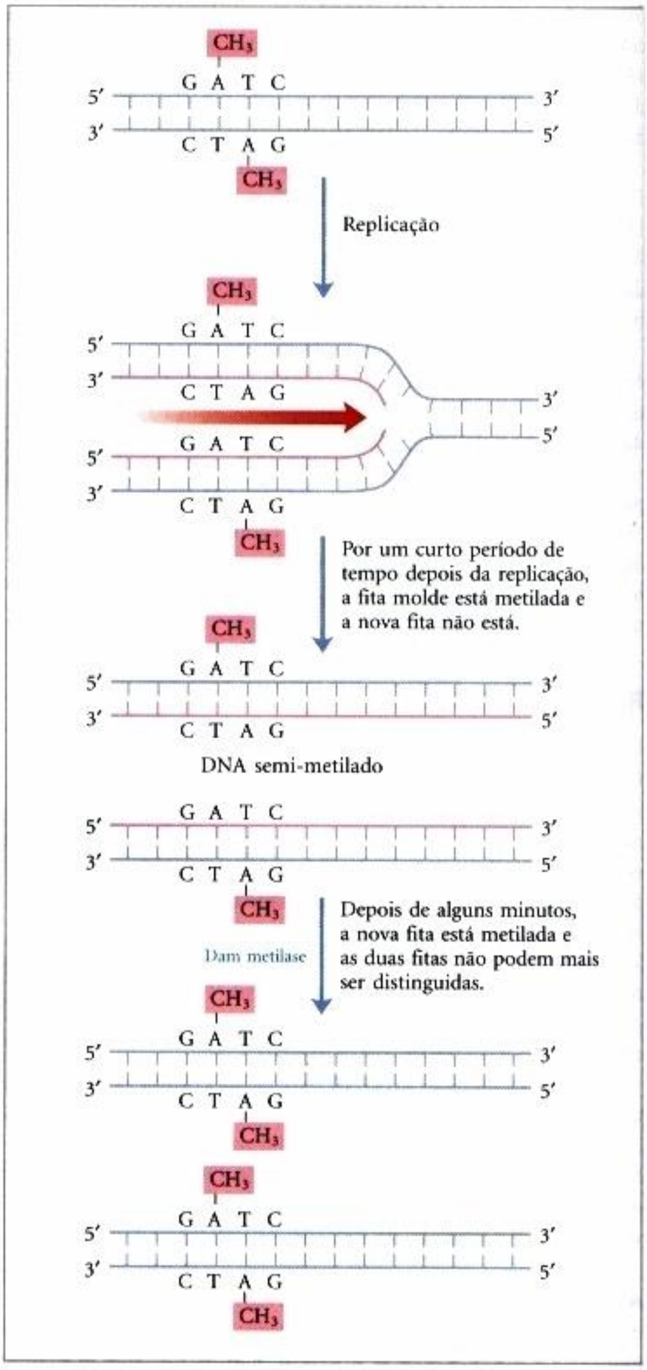


Figura 25-19 – Metilação e reparo de despareamento. A metilação das fitas de DNA pode servir para distinguir as fitas parentais (molde) das fitas recém-sintetizadas no DNA da *E. coli*, uma função que é crítica no reparo dos despareamentos (veja Fig. 25-20). A metilação ocorre no N^6 das adeninas nas seqüências (5′)GATC. Essa seqüência é um palíndromo (veja Fig. 10-20) e, portanto, está presente em orientações opostas em ambas as fitas.

também ser extraordinariamente ineficientes em um sentido energético — uma exceção ao padrão observado nas vias metabólicas, em que cada ATP é geralmente contado e usado otimizadamente. Quando a integridade da informação genética está em questão, a quantidade da energia química investida em um processo de reparo parece ser quase irrelevante.

O reparo do DNA é possível, principalmente, porque a molécula de DNA consiste de duas fitas complementares. A lesão em uma fita pode ser removida e cuidadosamente substituída, usando a fita complementar não-lesada como um molde.

Consideraremos, agora, os principais tipos de sistemas de reparo, começando com aqueles que reparam os raros erros de pareamentos de nucleotídeos, que são deixados pela replicação.

Reparo de despareamento. A correção dos despareamentos, depois da replicação na *E. coli*, aumenta a fidelidade geral do processo de replicação por um fator de 10^2 a 10^3. Os despareamentos são quase sempre corrigidos para corresponder à informação da fita velha (molde), de forma que o sistema de reparo deve, de alguma forma, discriminar entre o molde e a fita recém-sintetizada. A célula realiza essa discriminação marcando o DNA velho (molde) com grupos metila para distingui-lo das fitas recém-sintetizadas. O sistema de reparo dos despareamentos da *E. coli* inclui, pelo menos, 12 componentes protéicos (Tabela 25-5) que funcionam tanto na discriminação da fita como no próprio processo de reparo.

A discriminação da fita é baseada na ação de uma enzima chamada de Dam metilase (Tabela 25-3) que, como você se recorda, metila o DNA na posição N^6 de todas as adeninas que ocorrem nas seqüências (5′)GATC. Imediatamente, depois da passagem da forquilha de replicação, há um curto período (alguns poucos segundos ou minutos) durante o qual a fita molde está metilada, mas a fita recém-sintetizada não está (Fig. 25-19). O estado de submetilação transitória, das seqüências GATC na fita recém-sintetizada, permite que a nova fita seja distinguida da fita molde. Os erros de despareamentos nas vizinhanças de uma seqüência GATC semimetiladas são, então, reparados de acordo com a informação na fita parental metilada (molde). Testes *in vitro* mostram que, se ambas as fitas estão metiladas em uma seqüência GATC, poucos despareamentos são reparados; se nenhuma fita está metilada, o reparo ocorre, mas não favorece nenhuma fita. Esse sistema de reparo do despareamento, direcionado pelo grupo metila, repara corretamente os despareamentos distantes até 1.000 pares de bases de uma seqüência GATC semimetilada.

O mecanismo pelo qual as correções de despareamento são direcionadas por seqüências GATC relativamente distantes é ilustrado na Figura 25-20. A proteína MutL forma um complexo com a proteína MutS e se liga a todos os pares de bases despareados (exceto C–C). A proteína MutS liga-se à MutL e às seqüências GATC encontradas pelo complexo MutL-MutS. O DNA de ambos os lados do despareamento passa através do complexo MutL-MutS, criando uma alça de DNA; a movimentação simultânea de ambas as pernas da alça através do complexo é equivalente ao complexo se mover em ambas as direções de uma só vez ao longo do DNA. MutH possui uma atividade endonuclease sítio-específica que é inativa até que o complexo encontre uma seqüência GATC semimetilada. Nesse sítio, a MutH catalisa a clivagem da fita não-metilada no lado 5′ de G na GATC, o que marca a fita para o reparo. Outras etapas na via dependem de onde o despareamento esteja localizado em relação ao sítio de clivagem (Fig. 25-21).

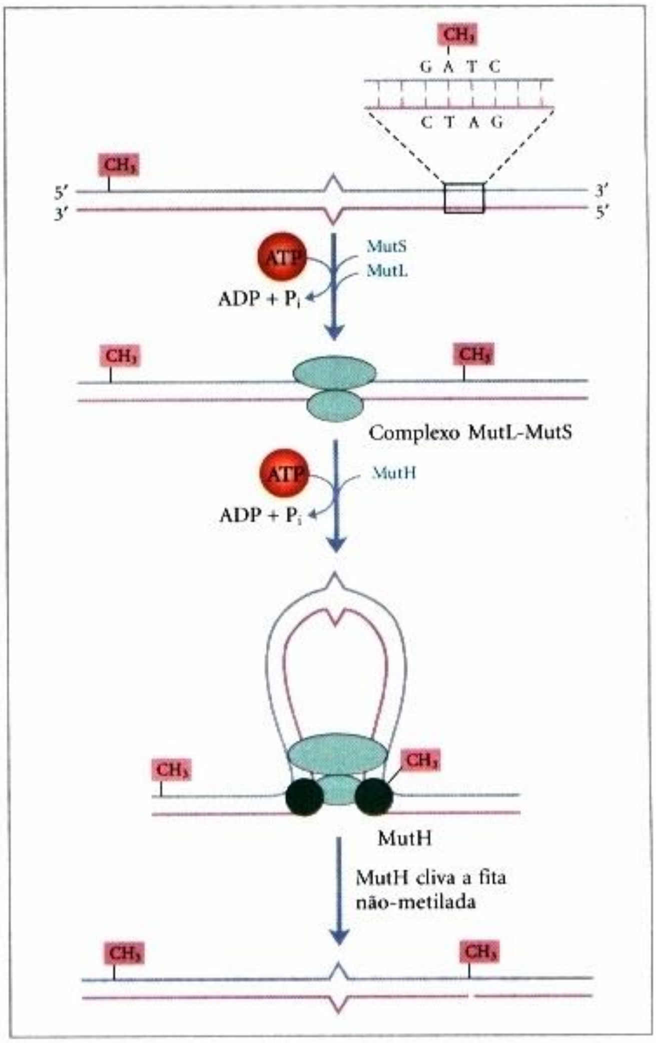

CH_3
G A T C
C T A G
5′
3′
3′
5′
ATP
ADP + P_i
MutS
MutL
Complexo MutL-MutS
MutH
MutH cliva a fita não-metilada

Figura 25-20 – Modelo para as etapas iniciais do reparo de despareamento direcionado pelo grupo metila. As proteínas envolvidas nesse processo em *E. coli* foram purificadas (veja Tabela 25-5). O reconhecimento da seqüência (5′)GATC e do despareamento são funções especiais das proteínas MutH e MutS, respectivamente. A proteína MutL forma um complexo com MutS no despareamento. O DNA passa através desse complexo de tal forma que o complexo se move simultaneamente em ambas as direções ao longo do DNA até que ele encontre a proteína MutH ligada a uma seqüência GATC semimetilada. A proteína MutH cliva a fita não-metilada no lado 5′ de G na seqüência GATC. Um complexo consistindo na DNA helicase II e uma de várias exonucleases degrada, então, a fita do DNA não-metilada a partir daquele ponto em direção ao despareamento (Fig. 25-21).

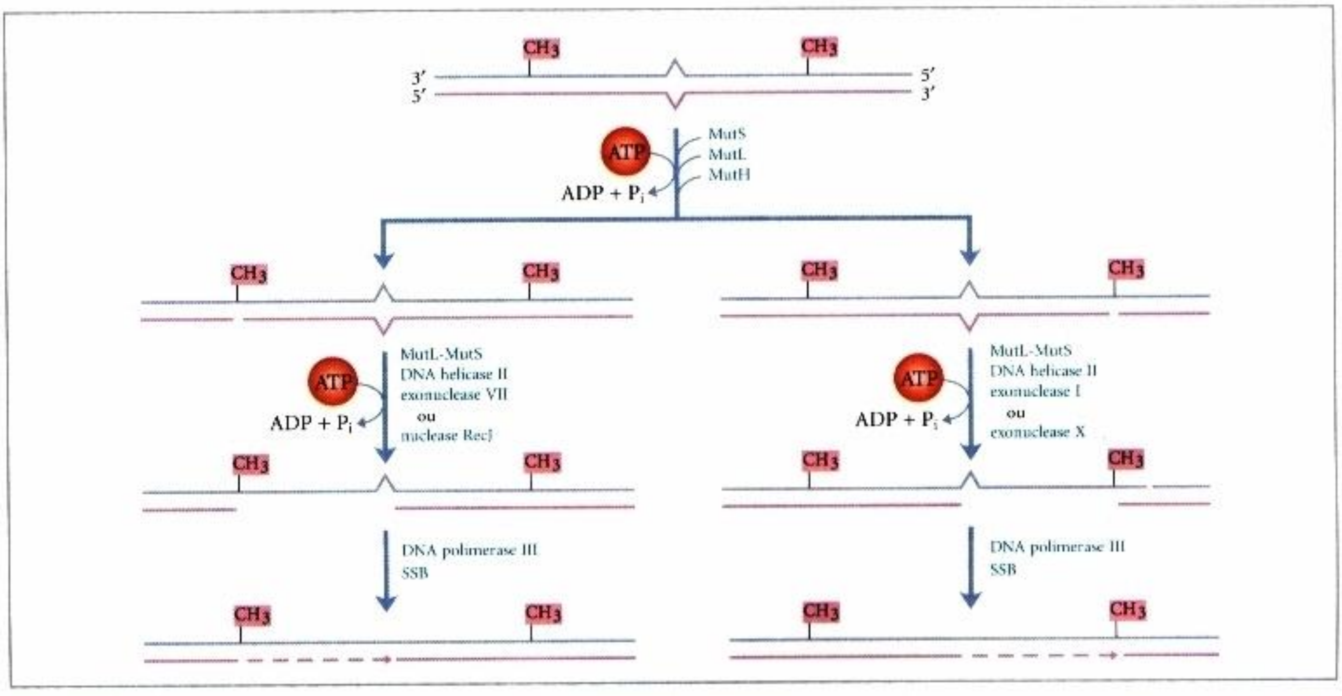

CH_3
3′
5′
5′
3′
ATP
ADP + P_i
MutS
MutL
MutH
MutL-MutS
DNA helicase II
exonuclease VII
ou
nuclease RecJ
MutL-MutS
DNA helicase II
exonuclease I
ou
exonuclease X
DNA polimerase III
SSB
DNA polimerase III
SSB

Figura 25-21 – Completando o reparo de despareamento direcionado pelo grupo metila. A ação combinada da DNA helicase II, SSB e uma das quatro exonucleases diferentes remove um segmento da nova fita entre o sítio de clivagem da MutH e um ponto logo adiante do despareamento. A exonuclease usada depende da localização do sítio de clivagem em relação ao despareamento. A lacuna resultante é preenchida pela DNA polimerase III, e a fenda selada pela DNA ligase (não mostrada).

Quando o despareamento for no lado 5′ do sítio de clivagem, a fita não-metilada é desenrolada e degradada na direção 3′→5′, a partir do sítio de clivagem até o despareamento, e esse segmento é substituído por DNA novo. Esse processo requer a ação combinada de DNA helicase II, SSB, exonuclease I ou exonuclease X (ambas degradando fitas de DNA na direção 3′→5′), DNA polimerase III e DNA ligase. A via para o reparo dos despareamentos no lado 3′ do sítio de clivagem é semelhante, exceto que a exonuclease é substituída pela exonuclease VII (que degrada fita simples de DNA tanto na direção 5′→3′ quanto na 3′→5′) ou pela nuclease RecJ (uma exonuclease que degrada fita simples de DNA 5′→3′).

O reparo de despareamento é um processo caro para a bactéria em termos de gastos energéticos. O despareamento pode estar 1.000 pares de bases ou mais de uma seqüência GATC. A degradação e a substituição de um segmento de fita dessa extensão requerem um enorme investimento na ativação de precursores desoxinucleotídeos para reparar o despareamento de uma *única* base. Isso novamente ressalta a importância da integridade genômica para a célula.

Toda as células eucarióticas possuem proteínas estruturais e funcionalmente análogas às proteínas MutS e MutL. Alterações em genes humanos que codificam proteínas desse tipo produzem algumas das síndromes de suscetibilidade aos cânceres mais comuns (Adendo 25-1), demonstrando mais ainda o valor dos sistemas de reparo do DNA para o organismo. O mecanismo detalhado do reparo de despareamento do DNA nos eucariotos ainda não foi estudado. Sabemos que o mecanismo pelo qual as fitas novas recém-sintetizadas são identificadas não envolve seqüências GATC e pode diferir de outras maneiras do sistema direcionado pela metilação, usado pelas bactérias.

Reparo por excisão de base. Toda célula possui uma classe de enzimas chamadas de **DNA glicosilases** que reconhecem lesões particularmente comuns do DNA (como os produtos das desaminações da citosina e adenina; veja Fig. 10-33a) e removem a base afetada clivando a ligação *N*-glicosídica. Essa clivagem cria um sítio apurínico ou apirimidínico no DNA, ambos comumente referidos como **sítios AP** ou abásicos. Cada DNA glicosilase é geralmente específica para um tipo de lesão.

A uracil glicosilase, por exemplo, encontrada na maioria das células, remove do DNA a uracila que resultar da desaminação espontânea da citosina. Células mutantes que não possuem essa enzima têm uma alta taxa de mutação em G═C em vez de em A═T. Essa glicosilase não remove os resíduos de uracila do RNA, nem remove resíduos de timina do DNA. Como explicado no Capítulo 10, a capacidade de distinguir timina dos produtos de desaminação de citosina (uracila), que é necessário para o reparo seletivo da última, pode ser uma das razões por que o DNA se desenvolveu para conter timina em vez de uracila.

Outras DNA glicosilases reconhecem e removem a hipoxantina (surgida da desaminação da uracila) e bases alquiladas, como 3-metiladenina e 7-metilguanina. Glicosilases que reconhecem outras lesões, incluindo dímeros de pirimidina, foram também identificadas. Lembre-se de que os sítios AP também surgiram da hidrólise lenta e espontânea das ligações *N*-glicosídicas no DNA (veja Fig. 10-33).

Adendo 25-1 Reparo do DNA e câncer

O câncer humano se desenvolve quando certos genes que regulam a divisão celular normal (oncogenes e genes supressores de tumores; veja Capítulo 13) falham ou estão alterados. As células podem crescer fora de controle e formar um tumor. Os genes que controlam a divisão celular podem ser lesados por mutação espontânea ou sobrepujados pela invasão de um tumor viral (Capítulo 26). Não surpreendentemente, alterações nos genes de reparo do DNA, que levam a um aumento na velocidade de mutação, podem aumentar muito a suscetibilidade ao câncer. Defeitos nos genes que codificam as proteínas envolvidas no reparo por excisão de nucleotídeos, no reparo de despareamento e no reparo de recombinação, todos eles têm sidos ligados ao câncer humano. Claramente, o reparo do DNA pode ser uma questão de vida ou de morte.

O reparo por excisão de nucleotídeo requer um número maior de proteínas no homem do que nas bactérias, embora as vias gerais sejam muito similares. Defeitos genéticos que inativam o reparo por excisão de nucleotídeo têm sido associados a várias doenças genéticas, a mais bem estudada é o xeroderma pigmentoso, ou XP. Pelo fato de o reparo por excisão de nucleotídeo ser a única via de reparo para os dímeros de pirimidina no homem, pessoas com XP são extremamente sensíveis à luz e facilmente desenvolvem cânceres de pele induzidos pela luz. A maioria das pessoas com XP possui também anormalidades neurológicas, presumivelmente por causa da sua inabilidade em reparar certas lesões causadas pela alta velocidade do metabolismo oxidativo nos neurônios.

Uma das síndromes mais comuns é o câncer do cólon não-poliposo herdável, ou HNPCC ("*h*ereditary *n*on*p*olyposis *c*olon *c*ancer"). Essa síndrome tem sido atribuída a defeitos no reparo de despareamento. Células humanas e outras eucarióticas possuem múltiplas proteínas análogas às proteínas MutL e MutS (veja Fig. 25-20a). Defeitos em, pelo menos, cinco genes diferentes de reparo de despareamento podem dar origem ao HNPCC. O mais prevalecente são os defeitos nos genes hMLH1 ("*h*uman *MutL* *h*omolog *1*", ou homólogo humano 1 do MutL) e hMSH2 ("*h*uman *MutS* *h*omolog *2*", ou homólogo humano 2 do MutS). Em indivíduos com HNPCC, o câncer geralmente se desenvolve em idade inicial, sendo os cânceres de cólon os mais comuns.

A maioria dos cânceres de mama humanos ocorre em mulheres com nenhuma predisposição. Entretanto, cerca de 10% dos casos são associados a defeitos herdados em dois genes, *Brca*1 e *Brca*2. As proteínas BRCA1 e BRCA2 interagem com uma proteína chamada Rad 51, a homóloga da proteína RecA. Isso sugere que BRCA1 e 2 estejam envolvidas no reparo de recombinação do DNA (veja Fig. 25-35). Mulheres com defeitos em qualquer um dos genes *Brca*1 e *Brca*2 têm uma probabilidade maior que 80% de desenvolver o câncer de mama.

Desde que um sítio AP tenha sido formado, um outro grupo de enzimas deve repará-lo. O reparo *não* é feito simplesmente pela inserção de uma nova base e reformação da ligação *N*-glicosídica. Ao contrário, a desoxirribose 5'-fosfato deixada atrás é removida e substituída por um novo nucleotídeo. Esse processo começa com enzimas chamadas de **AP endonucleases**, que cortam a fita do DNA que contém o sítio AP. A posição da incisão relativa ao sítio AP (5' ou 3') varia com diferentes AP endonucleases. Um segmento do DNA, incluindo o sítio AP, é então removido, o DNA é substituído pela ação da DNA polimerase I, e o corte remanescente é selado pela DNA ligase (Fig. 25-22).

Reparo por excisão de nucleotídeos. Lesões do DNA que causam grandes distorções na estrutura helicoidal do DNA geralmente são reparadas pelo sistema de excisão de nucleotídeos, uma via de reparo crítica para a sobrevivência de todos os organismos de vida livre. No reparo de excisão de nucleotídeo (Fig. 25-23), uma enzima com subunidades múltiplas hidrolisa duas ligações fosfodiésteres, uma em qualquer lado da lesão. Na *E. coli* e em outros procariotos, o sistema enzimático hidrolisa a quinta ligação fosfodiéster no lado 3', e a oitava ligação fosfodiéster, no lado 5', para gerar um fragmento de 12 a 13 nucleotídeos (dependendo se a lesão envolve uma ou duas bases). Em humanos e em outros eucariotos, a enzima hidrolisa a sexta ligação fosfodiéster no lado 3' e a vigésima segunda ligação fosfodiéster, no lado 5', produzindo um fragmento de 27 a 29 nucleotídeos. Após a dupla incisão,

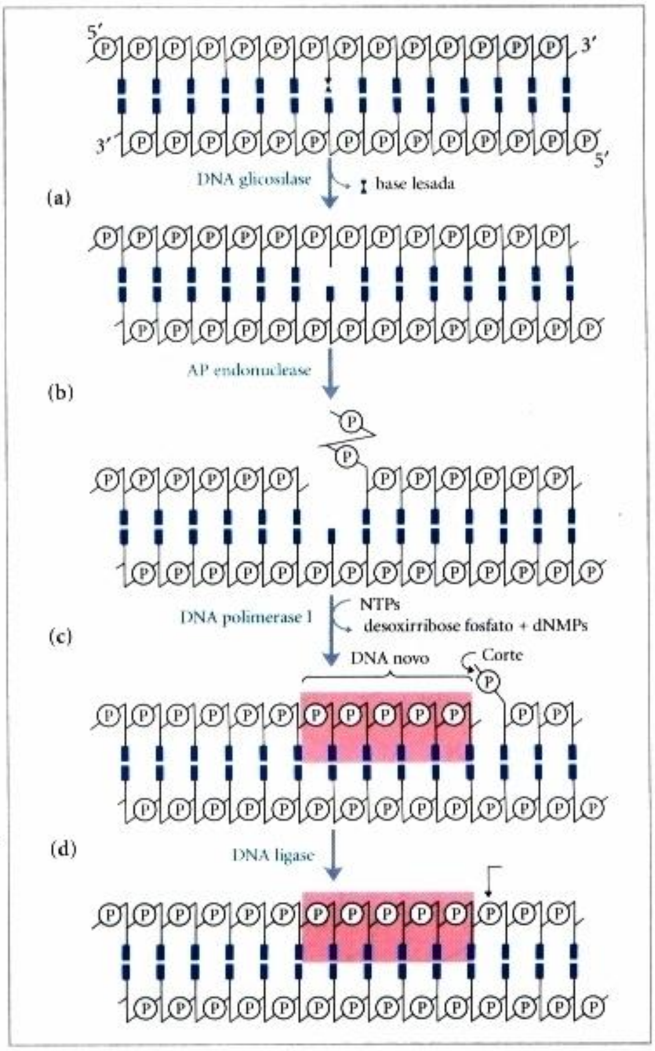


Figura 25-22 – Reparo do DNA pela via de excisão de base. (**a**) A DNA glicosilase reconhece uma base lesada e cliva entre a base e o esqueleto da desoxirribose. (**b**) Uma AP endonuclease cliva o esqueleto fosfodiéster perto do sítio AP. (**c**) A DNA polimerase I inicia o reparo sintetizando a partir da extremidade 3' OH do corte, removendo uma porção da fita lesada (com sua atividade exonucleásica 5'→3') e substituindo-a por DNA não-lesado. (**d**) O corte remanescente, depois que a DNA polimerase I tenha se dissociado, é selado pela DNA ligase.

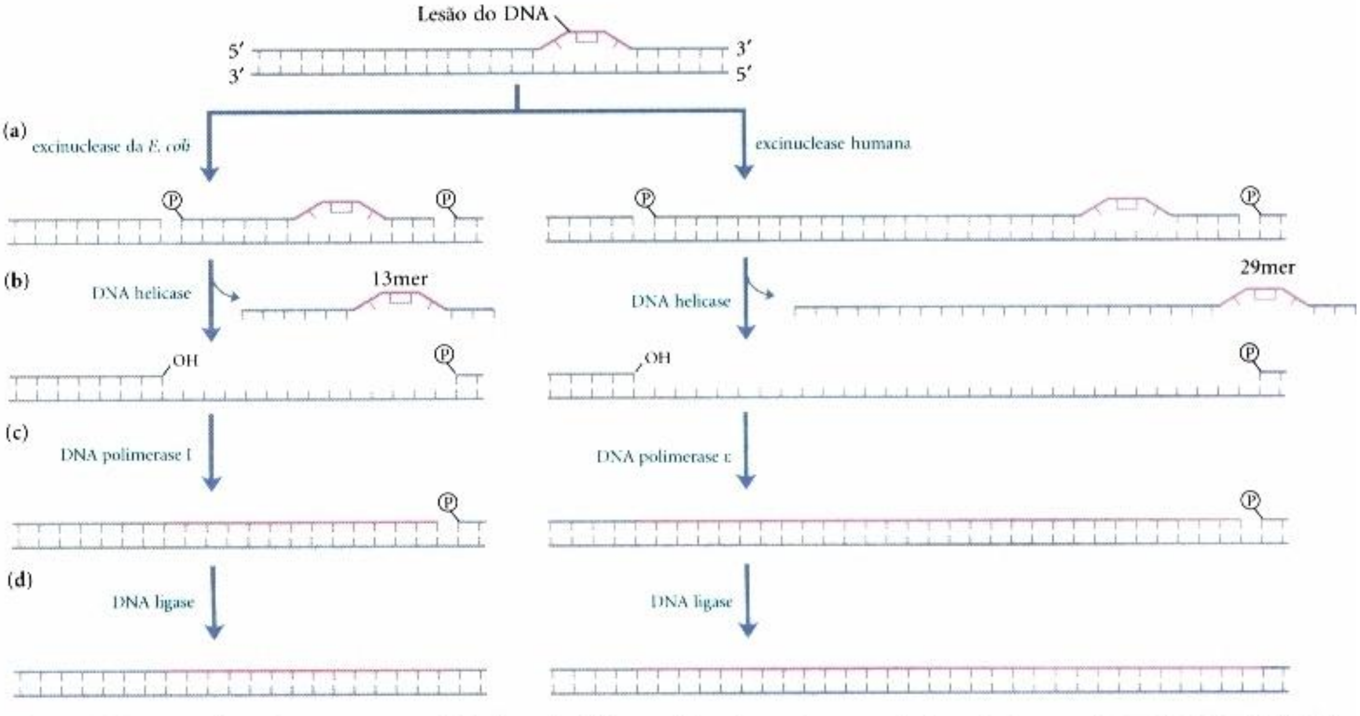


Figura 25-23 – Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos na *E. coli* e em humanos. A via geral do reparo de excisão do nucleotídeo é similar em todos os organismos. (**a**) Uma excinuclease se liga ao DNA no sítio de uma lesão volumosa. (**b**) A excinuclease cliva então a fita de DNA lesada em qualquer um dos lados da lesão, e o segmento de DNA é removido com a ajuda de uma helicase. (**c**) A lacuna resultante é preenchida pela DNA polimerase, e (**d**) o corte remanescente é selado pela DNA ligase.

os oligonucleotídeos excisados são liberados do dúplex, e a lacuna resultante é preenchida pela DNA polimerase I na *E. coli* e a DNA polimerase ε em humanos. O corte é selado pela DNA ligase.

Na *E. coli*, o complexo enzimático chave é a ABC excinuclease. Essa atividade é constituída por três subunidades, UvrA (M_r 104.000), UvrB (M_r 78.000) e UvrC (M_r 68.000). Um complexo das proteínas UvrA e UvrB (A_2B) rastrea o DNA e se liga ao sítio de uma lesão. O dímero UvrA então se dissocia, deixando um forte complexo UvrB-DNA. A proteína UvrC então se liga à UvrB, e a UvrB faz uma incisão na quinta ligação fosfodiéster no lado 3′ da lesão. Isso é seguido por uma incisão mediada pela UvrC na oitava ligação fosfodiéster no lado 5′. O fragmento de 12 a 13 nucleotídeos é removido pela UvrD helicase. A curta lacuna, assim criada, é preenchida pela DNA polimerase I e pela DNA ligase. Essa via é uma rota primária de reparo para muitos tipos de lesões, incluindo dímeros de pirimidina/ciclobutano, fotoprodutos 6-4 (veja Fig. 10-34), e vários outros tipos de adutos de base, incluindo benzo[*a*]pireno-guanina, que é formado no DNA pela exposição à fumaça do cigarro. A atividade nucleolítica da excinuclease ABC é nova no sentido de que dois cortes são feitos no DNA (Fig. 25-23). O termo "excinuclease" é usado para distinguir essa atividade das endonucleases-padrão.

As excinucleases eucarióticas funcionam, mecanisticamente, de uma maneira bastante similar à enzima bacteriana, embora 16 polipeptídeos, sem nenhuma semelhança com as subunidades da excinuclease da *E. coli*, sejam requeridos para a incisão dupla. Deficiências genéticas no reparo de excisão de nucleotídeos em humanos origina uma variedade de doenças graves (Adendo 25-1).

Reparo direto. Vários tipos de lesões são reparados sem a remoção da base ou do nucleotídeo. O exemplo mais bem caracterizado é a fotorreativação dos dímeros ciclobutano de pirimidina, uma reação promovida pela **DNA fotoliase.** Os dímeros de pirimidina resultam de uma reação induzida pela luz, e a fotoliase usa a energia derivada da luz absorvida para reverter essa lesão (Fig. 25-24). As fotoliases geralmente contêm dois co-fatores que

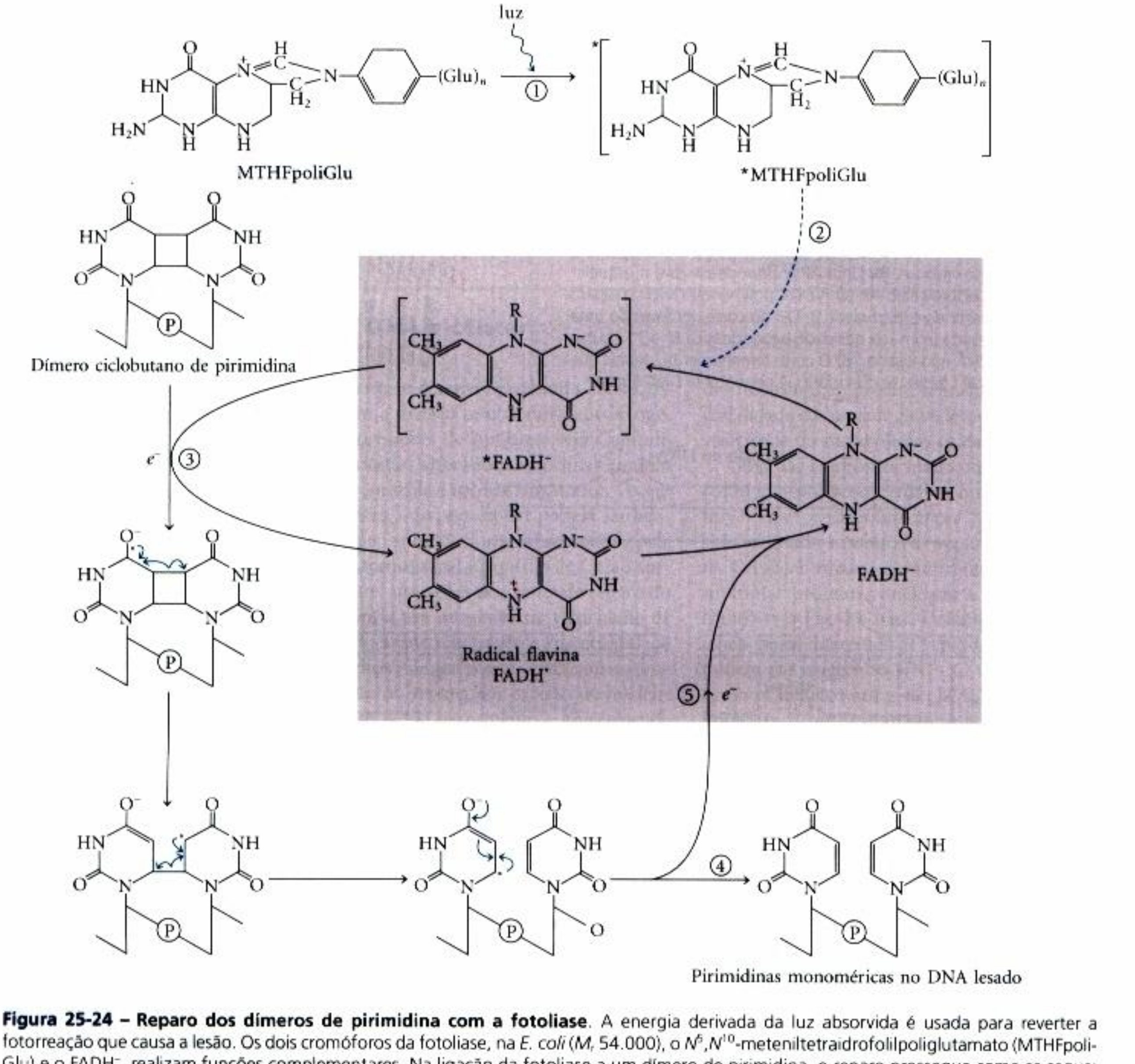
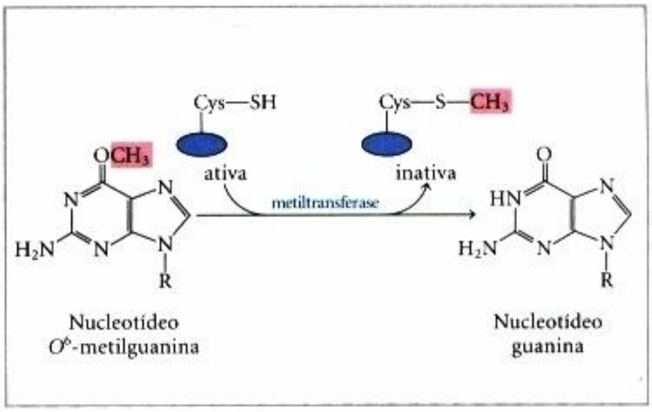

luz
①
MTHFpoliGlu
*MTHFpoliGlu
②
Dímero ciclobutano de pirimidina
e⁻ ③
*FADH⁻
Radical flavina FADH˙
FADH⁻
⑤ e⁻
④
Pirimidinas monoméricas no DNA lesado

Figura 25-24 – Reparo dos dímeros de pirimidina com a fotoliase. A energia derivada da luz absorvida é usada para reverter a fotorreação que causa a lesão. Os dois cromóforos da fotoliase, na *E. coli* (M_r 54.000), o N^5,N^{10}-meteniltetraidrofolilpoliglutamato (MTHFpoliGlu) e o $FADH^-$, realizam funções complementares. Na ligação da fotoliase a um dímero de pirimidina, o reparo prossegue como se segue: ① Um fóton de luz azul (300-500nm de comprimento de onda) é absorvido pelo N^5,N^{10}-meteniltetraidrofolilpoliglutamato, que funciona como uma foto-antena. ② A energia de excitação é transferida ao $FADH^-$ no sítio ativo da enzima. ③ A flavina excitada ($*FADH^-$) doa um elétron ao dímero de pirimidina (mostrado aqui em uma representação simplificada) para gerar um radical dímero instável. ④ O rearranjo eletrônico restaura as pirimidinas monoméricas, e ⑤ o elétron é transferido de volta ao radical flavina para regenerar o $FADH^-$.

servem como agentes absorvedores da luz, ou cromóforos. Um dos cromóforos é sempre o $FADH^-$. Na *E. coli* e na levedura, o outro cromóforo é um folato.

Um outro exemplo é o reparo da O^6-metilguanina, que se forma na presença de agentes alquilantes e é uma lesão altamente mutagênica e comum. Ela tende a parear com a timina, em vez de com a citosina, durante a replicação e, portanto, induz mutações G≡C em A=T (Fig. 25-25). O reparo direto da O^6-metilguanina é realizado pela O^6-metilguanina DNA metiltransferase, que catalisa a transferência do grupo metila da O^6-metilguanina a um resíduo específico de Cys na mesma proteína. Essa metiltransferase estritamente não é uma enzima, porque um único evento de transferência do grupo metil permanentemente metila a proteína, tornando-a inativa nessa via. O consumo de uma molécula protéica inteira para corrigir uma única base lesada é uma outra ilustração vivaz da prioridade dada à manutenção da integridade celular do DNA. Embora a metiltransferase metilada seja inativa no reparo, ela não é descartada; a proteína metilada funciona como um ativador transcricional (Capítulo 28), aumentando a expressão do seu próprio gene e de genes para algumas outras enzimas de reparo.


Cys—SH
Cys—S—CH₃
OCH₃
ativa
inativa
metiltransferase
Nucleotídeo
O⁶-metilguanina
Nucleotídeo
guanina

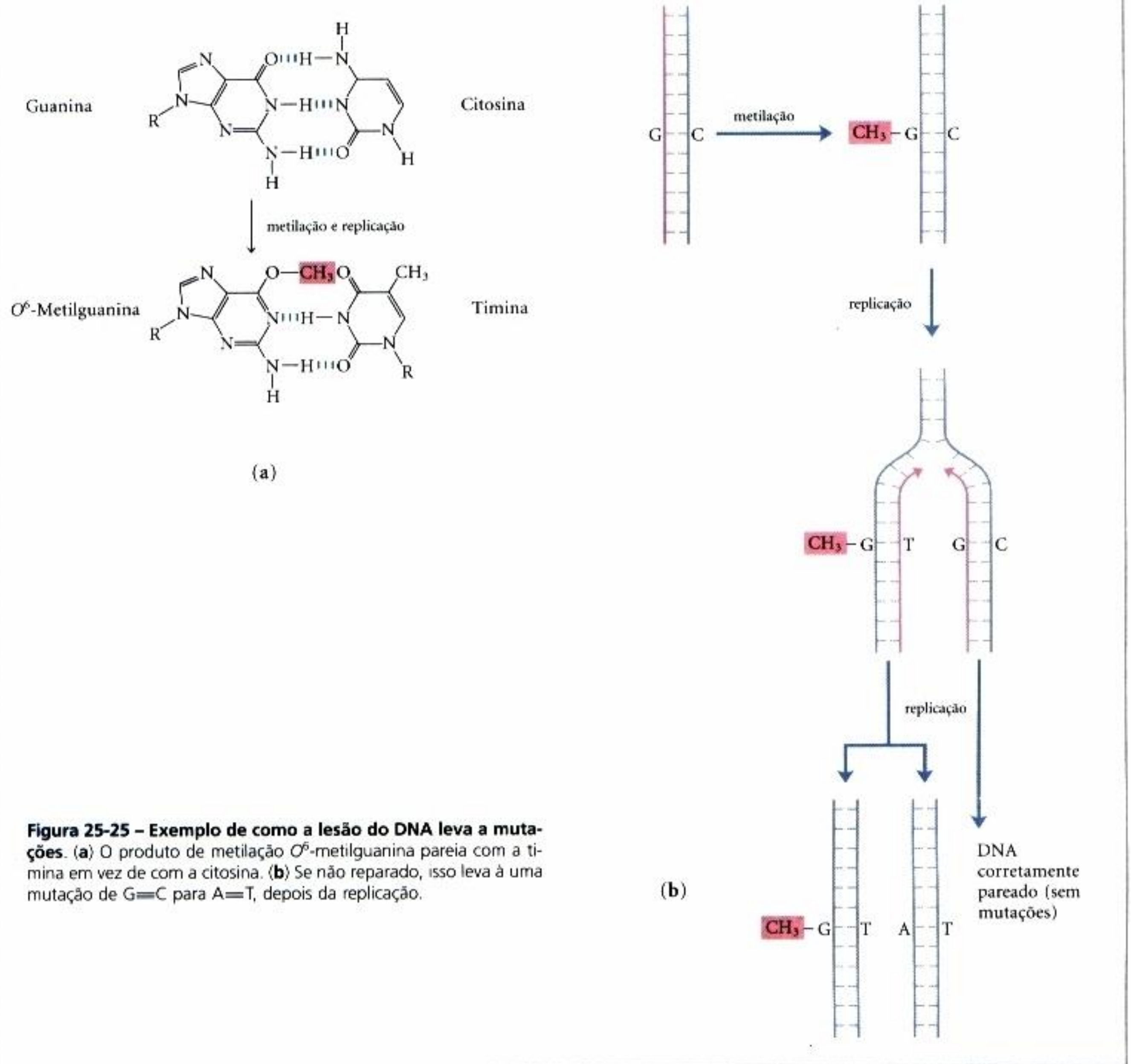

Guanina
Citosina
metilação e replicação
O⁶-Metilguanina
Timina
(a)
metilação
CH₃–G C
replicação
CH₃–G T G C
replicação
DNA corretamente pareado (sem mutações)
CH₃–G T A T
(b)

Figura 25-25 – Exemplo de como a lesão do DNA leva a mutações. (**a**) O produto de metilação O^6-metilguanina pareia com a timina em vez de com a citosina. (**b**) Se não reparado, isso leva à uma mutação de G≡C para A=T, depois da replicação.

A interação das forquilhas de replicação com o DNA lesado leva à recombinação ou ao reparo sujeito a erros

As vias de reparo, consideradas até este ponto, geralmente trabalham apenas para lesões na fita dupla do DNA, a fita não-lesada, fornecendo a informação genética correta para restaurar a fita lesada a seu estado original. Entretanto, em certos tipos de lesão, tais como quebras das fitas duplas, cruzamentos nas duas fitas ou lesões em um DNA de fita simples, a fita complementar está, ela própria, lesada ou ausente. Quebras das duas fitas e lesões no DNA de fita simples freqüentemente se originam quando a forquilha de replicação encontra um lesão de DNA não-reparada (Fig. 25-26). Tais lesões e cruzamentos no DNA podem também resultar da radiação ionizante e de reações oxidativas.

Em uma forquilha de replicação bacteriana parada, há duas avenidas para reparar. Na ausência de uma segunda fita para especificar o reparo, a informação requerida para o reparo preciso deve vir de um cromossomo homólogo separado. Ela, portanto, envolve a recombinação genética homóloga. Esse processo, chamado de **reparo de recombinação do DNA**, será considerado mais adiante neste capítulo. Toda vez que a lesão do DNA ocorrer em níveis inusitadamente altos (por exemplo, se a célula for exposta à luz ultravioleta forte), uma segunda via de reparo, chamada de **reparo sujeito a erros**, torna-se disponível. Quando essa via estiver ativa, o reparo do DNA torna-se significativamente menos preciso e ocorre uma alta taxa de mutação. O reparo sujeito a erros é parte de uma resposta celular ao estresse a lesões extensas do DNA chamadas, apropriadamente, **resposta SOS**.

Algumas proteínas SOS, tais como as proteínas UvrA e UvrB já descritas (Tabela 25-6), estão normalmente presentes na célula, mas são induzidas em altos níveis como parte da resposta SOS. Proteínas SOS adicionais participam numa nova via para o reparo, a via sujeita a erros. A proteína UmuD é clivada em uma forma menor, chamada UmuD', e esta forma um complexo com a proteína UmuC, criando uma DNA polimerase especializada (DNA polimerase V, que pode replicar sobre muitas lesões do DNA que, normalmente, bloqueiam a replicação). O próprio pareamento de base é freqüentemente impossível no local de tais lesões, de forma que essa replicação sobre lesões está sujeita a erros. Dada a ênfase na importância da integridade genômica em todo este capítulo, pode parecer incoerente que exista um sistema que aumente a velocidade de mutação. Entretanto, nós podemos pensar nesse sistema como uma estratégia desesperada. As mutações resultantes matam muitas células, mas esse é o preço biológico que as células pagam para contornar uma barreira, de outra forma intransponível para a replicação, à medida que ela permite que algumas poucas células mutantes sobrevivam. Além da DNA polimerase V, a replicação sobre lesões requer a proteína RecA, SSB e algumas subunidades derivadas da DNA polimerase III. Uma outra DNA polimerase, a DNA polimerase IV, é induzida durante a resposta SOS. A replicação pela DNA polimerase IV, um produto do gene *dinB*, está também altamente sujeita a erros. Alguns genes induzidos na resposta SOS possuem funções ainda desconhecidas (Tabela 25-6).

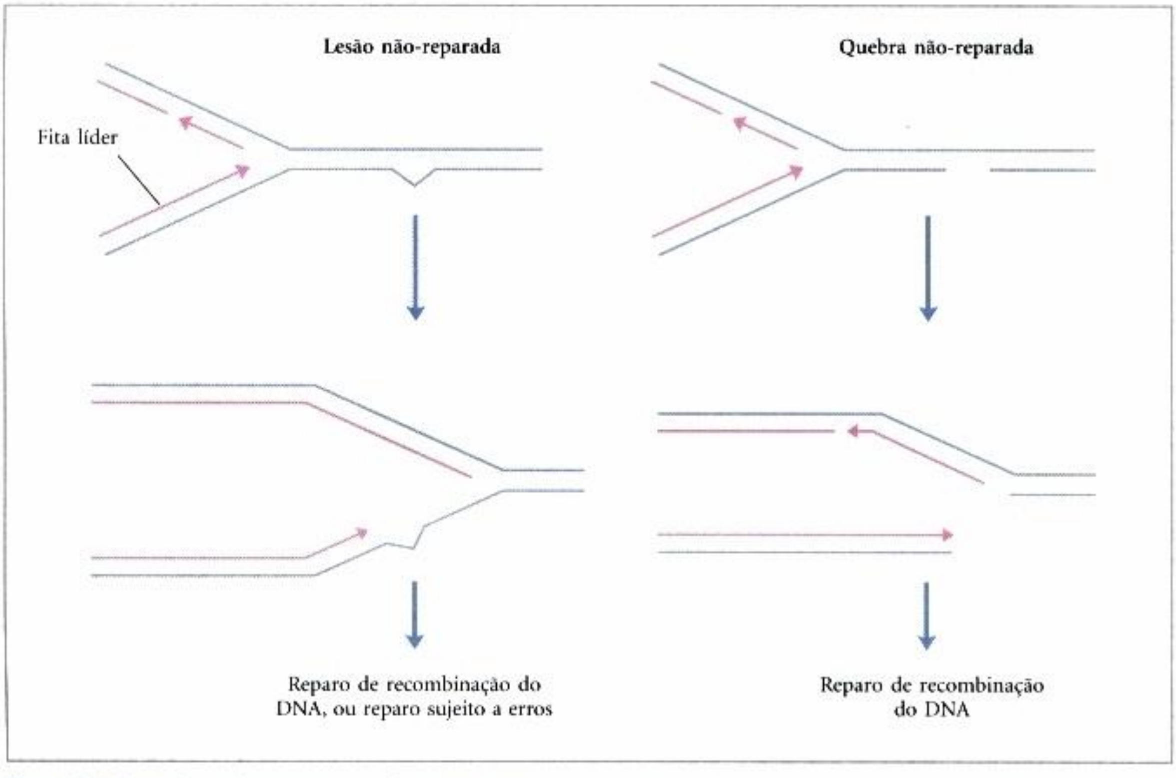

Lesão não-reparada
Quebra não-reparada
Fita líder
Reparo de recombinação do DNA, ou reparo sujeito a erros
Reparo de recombinação do DNA

Figura 25-26 – A lesão do DNA e seu efeito na replicação do DNA. Se a forquilha de replicação encontrar uma lesão não-reparada ou uma fita quebrada, a replicação geralmente pára e a forquilha pode colabar. A lesão é deixada para trás em um segmento de DNA de fita simples não-replicado; uma fita quebrada torna-se uma fita dupla quebrada. Em cada caso, a lesão de uma fita não pode ser reparada pelos mecanismos descritos anteriormente neste capítulo, porque a fita complementar requerida para dirigir um reparo preciso está lesada ou ausente. Há dois possíveis caminhos para o reparo: o reparo de recombinação do DNA (descrito na Fig. 25-35) ou, quando as lesões são inusitadamente numerosas, o reparo sujeito a erros. Este último mecanismo de reparo envolve uma nova DNA polimerase (DNA polimerase V, codificada pelos genes *umuC* e *umuD*) que podem replicar, embora incorretamente, sobre muitos tipos de lesão. Ele é chamado de sujeito a erros, porque resulta freqüentemente em mutações.

Tabela 25-6 – Genes induzidos como parte da resposta SOS na *E. coli*

Nome do gene	Proteína codificada e/ou papel no reparo do DNA
Genes de função conhecida	
*pol*B (*din*A)	Codifica a subunidade de polimerização da DNA polimerase II, requerida para o reparo sujeito a erros
*uvr*A	Codifica as subunidades UvrA e UvrB da excinuclease ABC
*uvr*B	
*umu*C	Codifica a DNA polimerase V
*umu*D	
*sul*A	Codifica proteína que inibe a divisão celular, possivelmente para obter tempo para o reparo do DNA
*rec*A	Codifica a proteína RecA requerida para os reparos sujeito a erros e de recombinação
*din*B	Codifica a DNA polimerase IV
Genes envolvidos no metabolismo do DNA, mas sem função conhecida no reparo do DNA	
ssb	Codifica a proteína de ligação à fita simples do DNA (SSB)
*uvr*D	Codifica a DNA helicase II (proteína desenroladora do DNA)
*him*A	Codifica a subunidade do fator de integração ao hospedeiro, envolvida na recombinação sítio-específica, replicação, transposição, regulação da expressão de vários genes
*rec*N	Envolvida no reparo de recombinação
Genes de função desconhecida	
*din*D	
*din*F	

Nota: Alguns desses genes e suas funções serão discutidos no Capítulo 28.

Você encontrará a proteína RecA novamente porque ela possui várias funções distintas na célula bacteriana. Seus papéis na recombinação e na regulação da resposta SOS são bem caracterizados. (A regulação da resposta SOS será descrita no Capítulo 28.) Voltaremos agora a uma discussão sobre a recombinação genética.

Recombinação do DNA

O rearranjo da informação genética no DNA e entre moléculas de DNA engloba uma variedade de processos que são coletivamente colocados sob o título de recombinação genética. Aplicações práticas dos rearranjos no DNA, na alteração de genomas de uma variedade de organismos estão agora sendo exploradas (Capítulo 29).

Os eventos da recombinação genética caem em, pelo menos, três classes gerais. **Recombinação genética homóloga** (também chamada de recombinação geral) envolve a troca genética entre quaisquer duas moléculas (ou segmentos da mesma molécula) que compartilham uma região extensa com seqüências quase idênticas. A seqüência real das bases é irrelevante, desde que as seqüências nos dois DNAs sejam semelhantes. A **recombinação sítio-específica** difere da recombinação homóloga em que essas trocas ocorrem apenas em uma seqüência *especial* do DNA. A **transposição do DNA** é distinta das outras classes, porque usualmente envolve um pequeno segmento de DNA com admirável capacidade de se movimentar de uma localização em um cromossomo para outra. Esses "genes saltadores" foram primeiro observados no milho, nos anos 1940, por Barbara McClintock. Além desses, há uma grande variedade de rearranjos não usuais para os quais nenhum mecanismo ou finalidade foi ainda proposto, entretanto iremos focalizar apenas essas três classes gerais.

As funções dos sistemas de recombinação genética são tão variadas como os seus mecanismos. Elas incluem a operação de sistemas especializados de reparo do DNA e atividades especializadas na replicação do DNA, a regulação da expressão de certos genes, a facilitação da própria segregação dos cromossomos durante a divisão celular nos eucariotos, a manutenção da diversidade genética e a implementação de rearranjos genéticos programados durante o desenvolvimento embrionário. Na maioria dos casos, a recombinação genética é intimamente integrada com outros processos no metabolismo do DNA, e isso se torna um tema de nossa discussão.

Barbara McClintock (1902-1992)

A recombinação genética homóloga possui funções múltiplas

Nas bactérias, a recombinação genética homóloga é primariamente um processo de reparo do DNA, e, nesse contexto, é referida como um **reparo de recombinação do DNA**. Ela é usualmente direcionada para a reconstrução das forquilhas de replicação paradas no local da lesão do DNA. A recombinação genética homóloga pode também ocorrer durante processos, tais como conjugação (acasalamento), quando o DNA cromossomal é transferido de um doador para uma célula bacteriana recipiente. A recombinação, durante a conjugação, apesar de rara nas populações bacterianas selvagens, contribui para a diversidade genética.

Nos eucariotos, a recombinação genética homóloga está geralmente associada à divisão celular (garantindo a segregação ordenada dos cromossomos) e ao reparo do DNA. A recombinação ocorre com maior freqüência durante a **meiose**, processo no qual células diplóides da linhagem germinativa, com dois conjuntos iguais de cromossomos, dividem-se para produzir **gametas** haplóides — espermatozóide ou óvulo nos eucariotos superiores —, cada gameta possuindo apenas um membro de cada par de cromossomos (Fig. 25-27). Em resumo, a meiose começa com a replicação do DNA na célula da linhagem germinativa de

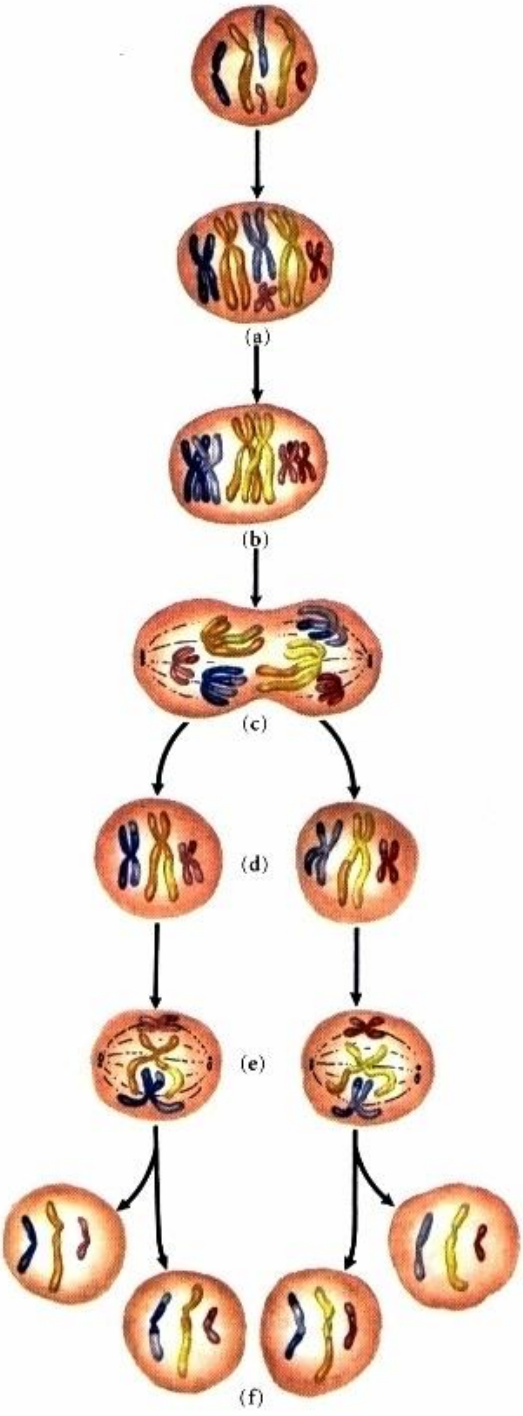


Figura 25-27 – Meiose nas células eucarióticas da linhagem germinativa. (**a**) Os cromossomos de uma célula diplóide hipotética da linhagem germinativa (seis cromossomos; três pares homólogos) são replicados e mantidos juntos a seus centrômeros. Cada molécula de fita dupla replicada é chamada uma cromátide (cromátide irmã). (**b**) Na prófase I, pouco antes da primeira divisão meiótica, os três conjuntos de cromátides homólogas são alinhados para formar tétrades, mantidas juntas por ligações covalentes nas junções homólogas (quiasmas). As permutas ocorrem dentro dos quiasmas (veja Fig. 25-28). Essas associações transitórias ajudam a garantir que os dois cromossomos amarrados segreguem apropriadamente nos pólos opostos na próxima etapa. (**c**) Os pares homólogos se separam e migram para os pólos opostos de uma célula em divisão. (**d**) A primeira divisão meiótica produz duas células filhas, cada uma com três pares de cromátides. (**e**) Os pares homólogos se alinham no equador da célula para o preparo da separação das cromátides (que são chamados, agora, de cromossomos). (**f**) A segunda divisão meiótica produz quatro células filhas haplóides que podem funcionar como gametas. Cada uma possui três cromossomos, metade do número da célula diplóide da linhagem germinativa. Os cromossomos foram separados e recombinados.

tal forma que cada molécula do DNA esteja presente em quatro cópias. A célula, então, entra em duas rodadas de divisão celular, sem um ciclo interveniente de replicação do DNA. Isso reduz o conteúdo do DNA ao nível haplóide em cada gameta.

Depois que o DNA for replicado durante a prófase da primeira divisão meiótica, as cópias resultantes do DNA permanecem associadas a seus centrômeros e são referidas como cromátides irmãs. Nesse estágio, cada conjunto de quatro moléculas de DNA homólogas consiste em dois pares de cromátides. A informação genética é agora trocada entre as cromátides homólogas intimamente associadas, nessa etapa da meiose, por meio da recombinação genética homóloga, um processo que envolve a quebra e a reunião do DNA (Fig. 25-28). Essa troca, também chamada de permutação ("crossing over"), pode ser observada ao microscópio óptico. A permutação liga dois pares de cromátides irmãs em pontos chamados de quiasmas.

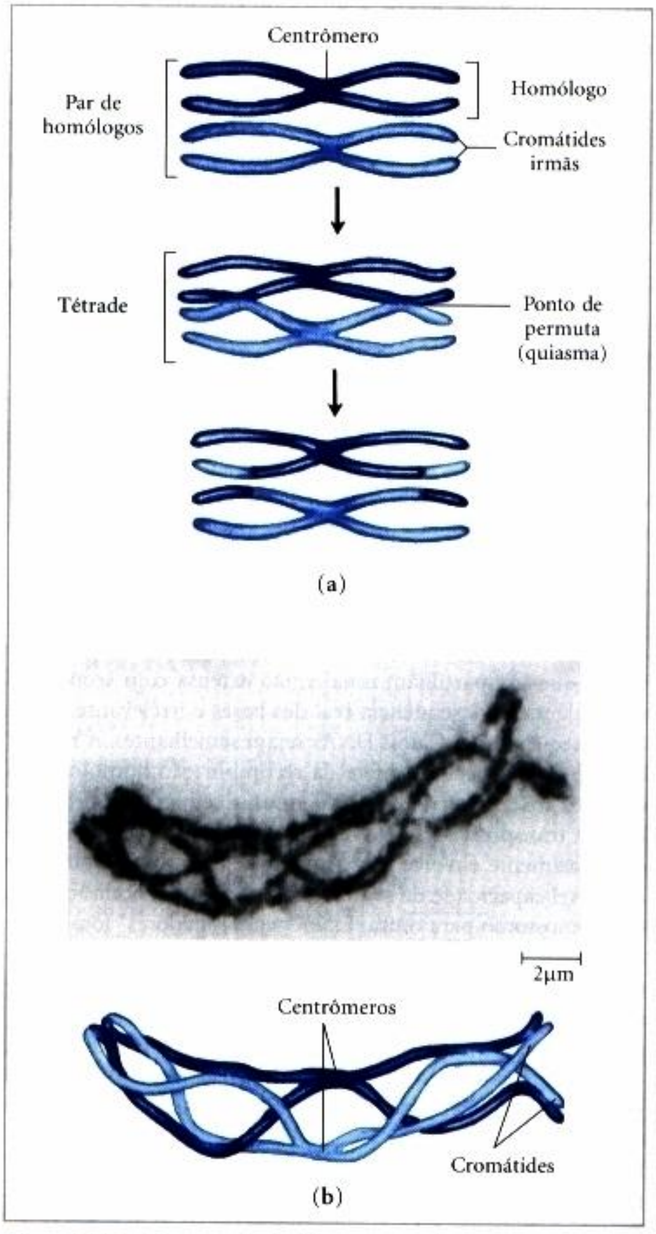
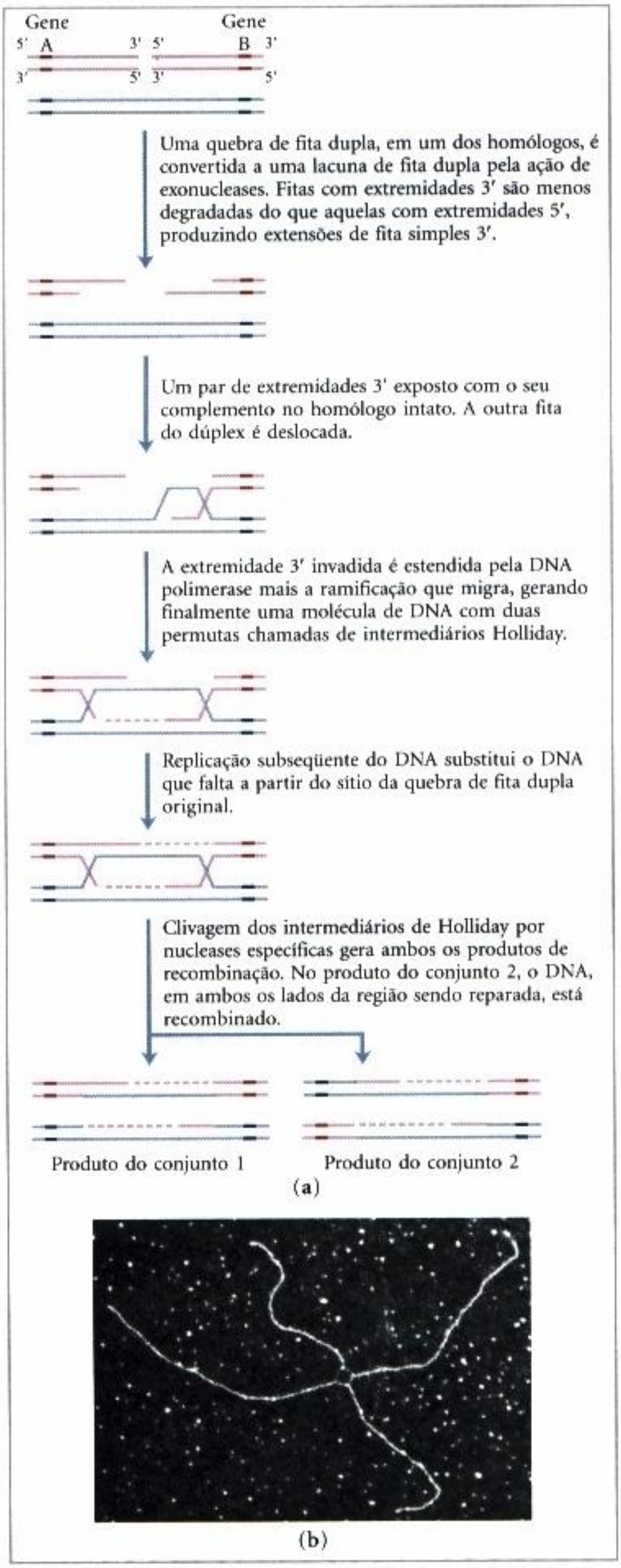


Figura 25-28 – Permutação. (**a**) A permutação freqüentemente produz uma troca de material genético. (**b**) Os cromossomos homólogos de um gafanhoto são mostrados durante a prófase I da meiose. Pontos múltiplos de união (quiasmas) são evidentes entre os dois pares homólogos das cromátides. Esses quiasmas são a manifestação física de eventos de recombinação homóloga anterior (permutação).



Uma quebra de fita dupla, em um dos homólogos, é convertida a uma lacuna de fita dupla pela ação de exonucleases. Fitas com extremidades 3′ são menos degradadas do que aquelas com extremidades 5′, produzindo extensões de fita simples 3′.

Um par de extremidades 3' exposto com o seu complemento no homólogo intato. A outra fita do dúplex é deslocada.

A extremidade 3′ invadida é estendida pela DNA polimerase mais a ramificação que migra, gerando finalmente uma molécula de DNA com duas permutas chamadas de intermediários Holliday.

Replicação subseqüente do DNA substitui o DNA que falta a partir do sítio da quebra de fita dupla original.

Clivagem dos intermediários de Holliday por nucleases específicas gera ambos os produtos de recombinação. No produto do conjunto 2, o DNA, em ambos os lados da região sendo reparada, está recombinado.

Figura 25-29 – Recombinação durante a meiose. (**a**) Modelo de reparo da quebra de fita dupla para a recombinação genética homóloga. Os dois cromossomos homólogos envolvidos nesse evento recombinante possuem seqüências similares. Cada um dos dois genes mostrados possui diferentes alelos nos dois cromossomos. As fitas de DNA e os alelos são coloridos diferentemente de forma que os seus destinos possam ser seguidos. As etapas são descritas no texto. (**b**) Um intermediário Holliday, formado entre dois plasmídios bacterianos *in vivo*, como visto ao microscópio eletrônico. Os intermediários foram nomeados por Robin Holliday, quem primeiro propôs sua existência, em 1964.

A permutação efetivamente liga todas as quatro cromátides homólogas, uma ligação que é essencial para a segregação apropriada dos cromossomos em divisões celulares meióticas subseqüentes. A permutação não é um processo inteiramente ao acaso, e "pontos quentes" têm sido identificados em muitos cromossomos eucarióticos. Entretanto, a suposição de que a permutação pode ocorrer com igual probabilidade em quase qualquer ponto ao longo de dois cromossomos homólogos permanece uma aproximação razoável, em muitos casos, e é essa suposição que permite o mapeamento genético dos genes. A freqüência de recombinação em uma região, separando dois pontos em um cromossomo, é aproximadamente proporcional à distância entre os pontos, permitindo que sejam determinadas as posições relativas e as distâncias entre genes diferentes.

A recombinação homóloga serve, dessa forma, a pelo menos três funções identificáveis: (1) ela contribui para o reparo de vários tipos de lesão do DNA; (2) ela fornece, nas células eucarióticas, uma ligação física transitória entre as cromátides, que promove a segregação ordenada dos cromossomos na primeira divisão celular da meiose, e (3) ela aumenta a diversidade genética da população.

A recombinação durante a meiose é iniciada com quebras das fitas duplas

Uma provável via para a recombinação homóloga, durante a meiose, é esquematizada na Figura 25-29a. O modelo apresenta quatro características-chave. Primeira, os cromossomos homólogos são alinhados. Segunda, uma quebra da fita dupla em uma molécula de DNA é aumentada por uma exonuclease, de forma que uma extensão de fita simples com um grupo hidroxila 3′ livre é deixada na extremidade quebrada (etapa ① na Fig. 25-29a). Terceira, as extremidades 3′ expostas invadem o DNA dúplex intacto, e isso é seguido pela **migração da ramificação** (Fig. 25-30) e/ou pela replicação para criar um par de estruturas de permutação, chamadas de junções de Holliday (etapas ② a ④). Quarta, a clivagem de duas permutações cria dois produtos recombinantes completos (etapa ⑤).

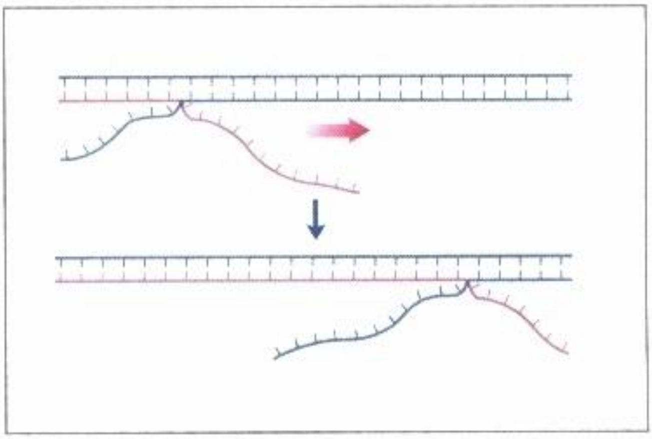


Figura 25-30 – A migração da ramificação. Quando uma fita molde pareia com duas fitas complementares diferentes, uma ramificação é formada no ponto em que as três fitas complementares se encontram. A ramificação "migra" quando um par de bases de uma das duas fitas complementares for quebrada e substituída por um par de base da outra fita complementar. Na ausência de uma enzima para direcioná-lo, esse processo pode mover a ramificação espontaneamente em qualquer direção. A migração da ramificação espontânea é bloqueada toda vez que uma das fitas complementares possuir uma seqüência não idêntica à outra.

Nesse **modelo de reparo com quebras das fitas duplas** para a recombinação, as extremidades 3′ são usadas para iniciar a troca genética. Assim que pareadas com a fita complementar no homólogo intacto, uma região de DNA híbrido é criada, contendo fitas complementares de dois DNAs parentais diferentes (o produto da etapa ② na Fig. 25-29a). Cada uma das extremidades 3′ pode, então, agir como um iniciador para a replicação do DNA. As estruturas que são formadas, chamadas de **intermediários de Holliday** (Fig. 25-29b), são uma característica das vias de recombinação genéticas homólogas em todos os organismos.

A recombinação homóloga pode variar em muitos detalhes de uma espécie para outra, entretanto a maioria das etapas esquematizadas anteriormente está geralmente presente de alguma forma. Há duas maneiras de se clivar ou "resolver" o intermediário Holliday, de forma que os dois produtos recombinantes carreguem os genes na mesma ordem linear que a dos substratos (os cromossomos não-recombinados, originais). Se clivado de uma maneira, o DNA que flanqueia a região, que contém o DNA híbrido, não é recombinada; se clivado de outra maneira, o DNA flanqueado é recombinado (etapa ⑤ da Fig. 25-29a). Ambos os resultados são observados, *in vivo*, tanto nos procariotos quanto nos eucariotos.

A recombinação homóloga, ilustrada na Figura 25-29, é um processo muito elaborado com sutis conseqüências moleculares para a geração da diversidade genética. Para compreender como esse processo contribui para a diversidade, é importante observar que dois cromossomos homólogos que sofrem recombinação não são necessariamente *idênticos*. A disposição linear dos genes pode ser a mesma, mas as seqüências de bases, em alguns dos genes, pode diferir sutilmente (em alelos diferentes). Em um homem, por exemplo, um cromossomo pode conter o gene normal para a hemoglobina (hemoglobina A), enquanto o outro pode conter o alelo para a hemoglobina S ("sickle-cell mutation", ou a mutação da célula falciforme). A diferença pode representar não mais que um par de bases entre milhões. A recombinação homóloga não altera a disposição linear dos genes, mas pode determinar quais alelos se tornam ligados a um único cromossomo.

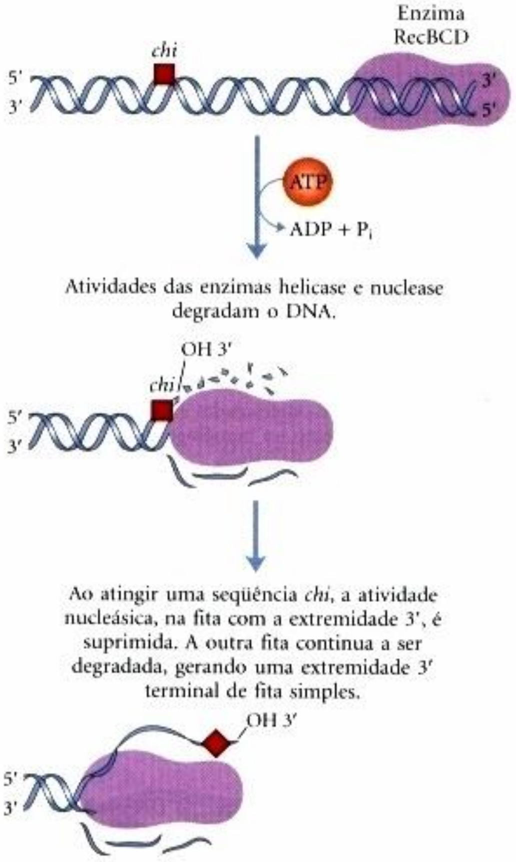

Enzima
RecBCD
chi
5′
3′
3′
5′
ATP
ADP + P_i
Atividades das enzimas helicase e nuclease degradam o DNA.
OH 3′
chi
5′
3′
Ao atingir uma seqüência *chi*, a atividade nucleásica, na fita com a extremidade 3′, é suprimida. A outra fita continua a ser degradada, gerando uma extremidade 3′ terminal de fita simples.
OH 3′
5′
3′

Figura 25-31 – Atividades helicase e nuclease da enzima RecBCD. Ao entrar na extremidade de uma dupla fita, a RecBCD desenrola e degrada o DNA até que ela encontre uma seqüência *chi*. A interação com *chi* altera a atividade da RecBCD de tal forma que ela gera um DNA de fita simples com uma extremidade 3′, adequado para as etapas subseqüentes na recombinação. A movimentação da enzima requer hidrólise do ATP. Acredita-se que essa enzima ajuda a iniciar a recombinação genética homóloga na *E. coli*. Ela também está envolvida no reparo de fitas duplas quebradas nas forquilhas de replicação colabadas.

A recombinação requer enzimas específicas

Enzimas que promovem várias etapas da recombinação homóloga foram isoladas, tanto em procariotos quanto em eucariotos. Na *E. coli*, os genes *rec*A, B, C e D codificam a enzima RecBCD, que possui tanto a atividade helicase como a nuclease. A proteína RecA promove todas as etapas centrais do processo de recombinação homóloga: o pareamento dos dois DNAs, a formação dos intermediários Holliday e a migração da ramificação (como descrito a seguir). As proteínas RuvA e B formam um complexo que se liga aos intermediários de Holliday, deslocam a proteína RecA e promovem a migração da ramificação a velocidades maiores do que faz a RecA. Nucleases que clivam especificamente os intermediários Holliday, freqüentemente chamadas de resolvases, têm sido isoladas de bactérias e de levedura. A proteína RuvC é uma de, pelo menos, duas de tais nucleases na *E. coli*.

A enzima RecBCD se liga ao DNA linear em uma extremidade livre (quebrada) e se move para dentro da dupla hélice, desenrolando e degradando o DNA em uma reação acoplada à hidrólise do ATP (Fig. 25-31). A atividade da enzima é alterada quando ela interage com uma seqüência chamada *chi*, (5′)GCTGGTGG. A partir desse ponto, a degradação da fita com um terminal 3′ é muito reduzida, mas a degradação da fita terminal 5′ é aumentada. Um DNA de fita simples com uma extremidade 3′ é, portanto, criado, uma estrutura usada durante etapas subseqüentes na recombinação (Fig. 25-29). As 1.009 seqüências *chi* espalhadas no genoma da *E. coli* promovem a recombinação nas regiões onde elas ocorrem. Seqüências que aumentam a freqüência de recombinação foram também identificadas em vários outros organismos.

A proteína RecA é incomum entre as proteínas do metabolismo do DNA no sentido de que sua forma ativa é um filamento helicoidal ordenado, de até vários milhares de monômeros da RecA que se montam cooperativamente no DNA (Fig. 25-32). Esse filamento normalmente se forma em uma fita simples de DNA, tal como aquela produzida pela enzima RecBCD. O filamento se formará também em um DNA dúplex com uma lacuna de fita simples. Nesse caso, os primeiros monômeros da RecA se ligam ao DNA de fita simples na lacuna, depois que o filamento montado rapidamente envolve a vizinhança de fita dupla. As proteínas RecF, RecO e RecR regulam a montagem e a desmontagem dos filamentos de RecA.

Um modelo útil para ilustrar as atividades de recombinação do filamento de RecA é a reação, *in vitro*, de troca de fita do DNA (Fig. 25-33). Um DNA dúplex homólogo é levantado e alinhado com um DNA de fita simples já ligado com o filamento RecA. As fitas são então trocadas entre os dois DNAs para criar o DNA híbrido. A troca ocorre a uma velocidade de 6 pares de bases por

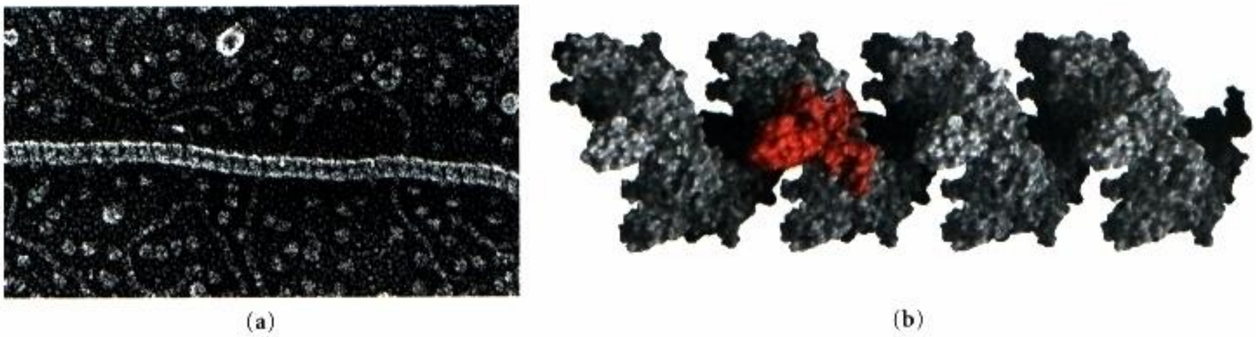
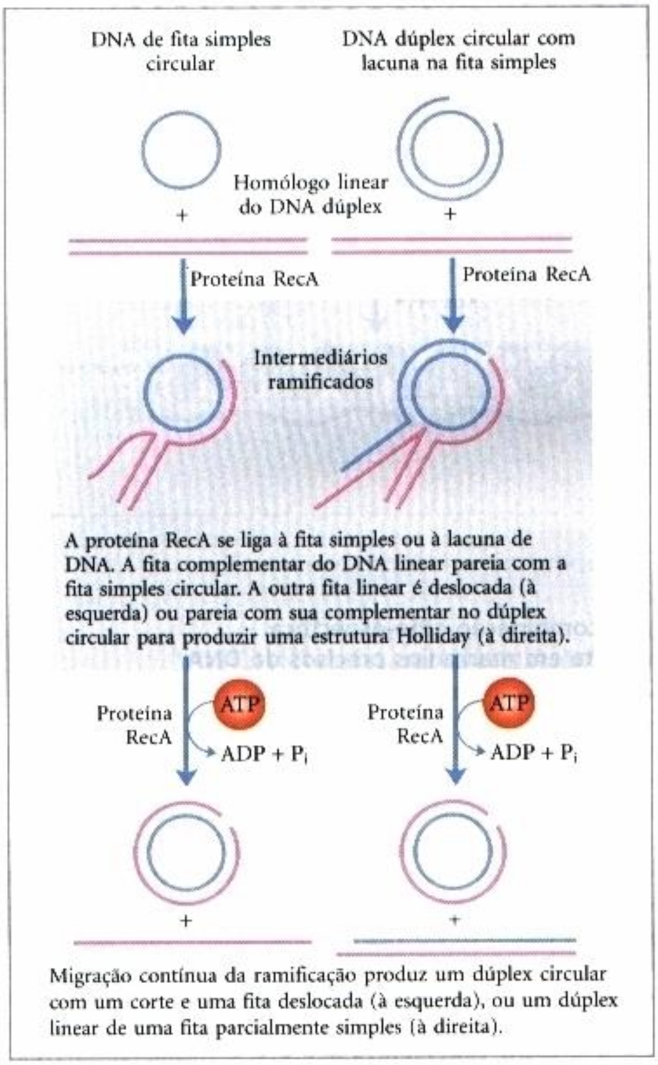


Figura 25-32 – RecA. (**a**) Filamento nucleoprotéico da proteína RecA em um DNA de fita simples, como visto ao microscópio eletrônico. As estriações indicam a estrutura helicoidal de direção da mão direita do filamento. (**b**) Modelo da superfície de contorno da estrutura molecular de um filamento de 24 subunidades da RecA. O filamento possui seis subunidades por volta. Uma subunidade está colorida em vermelho para fornecer perspectiva.


DNA de fita simples circular
DNA dúplex circular com lacuna na fita simples
Homólogo linear do DNA dúplex
+
+
Proteína RecA
Proteína RecA
Intermediários ramificados
Proteína RecA
ATP
ADP + P$_i$
Proteína RecA
ATP
ADP + P$_i$
+
+

A proteína RecA se liga à fita simples ou à lacuna de DNA. A fita complementar do DNA linear pareia com a fita simples circular. A outra fita linear é deslocada (à esquerda) ou pareia com sua complementar no dúplex circular para produzir uma estrutura Holliday (à direita).

Migração contínua da ramificação produz um dúplex circular com um corte e uma fita deslocada (à esquerda), ou um dúplex linear de uma fita parcialmente simples (à direita).

Figura 25-33 – Reações de troca da fita do DNA promovida pela proteína RecA *in vitro*. A troca de fita envolve a separação de uma fita da sua complementar em um DNA dúplex, e a transferência dessa fita para uma fita complementar alternativa, para formar um novo DNA dúplex (heterodúplex). A transferência forma um intermediário ramificado. A formação do produto final depende da migração da ramificação, que é facilitada pela RecA. A reação pode envolver três fitas (à esquerda) ou uma troca recíproca entre dois dúplex homólogos — quatro fitas ao todo (à direita). Quando quatro fitas estão envolvidas, o intermediário ramificado resultante é uma estrutura Holliday. A proteína RecA promove as fases de migração da ramificação dessas reações, usando a energia derivada da hidrólise do ATP.

segundo e progride na direção 5'→3', relativa ao DNA de fita simples dentro do filamento. Essa reação pode envolver três ou quatro fitas (Fig. 25-33); no último caso, uma estrutura Holliday se forma durante o processo.

À medida que o DNA dúplex é incorporado dentro do filamento da RecA e alinhado com centenas de pares de bases do DNA de fita simples, uma fita do dúplex troca parceiros pareados (Fig. 25-34b). Pelo fato de o DNA ser uma estrutura helicoidal, a troca continuada de fitas requer uma rotação ordenada dos dois DNAs alinhados. Isso ocasiona uma ação de embobinamento (Fig. 25-34c, d) que move o ponto de ramificação ao longo da hélice. O ATP é hidrolisado pela proteína RecA durante essa reação.

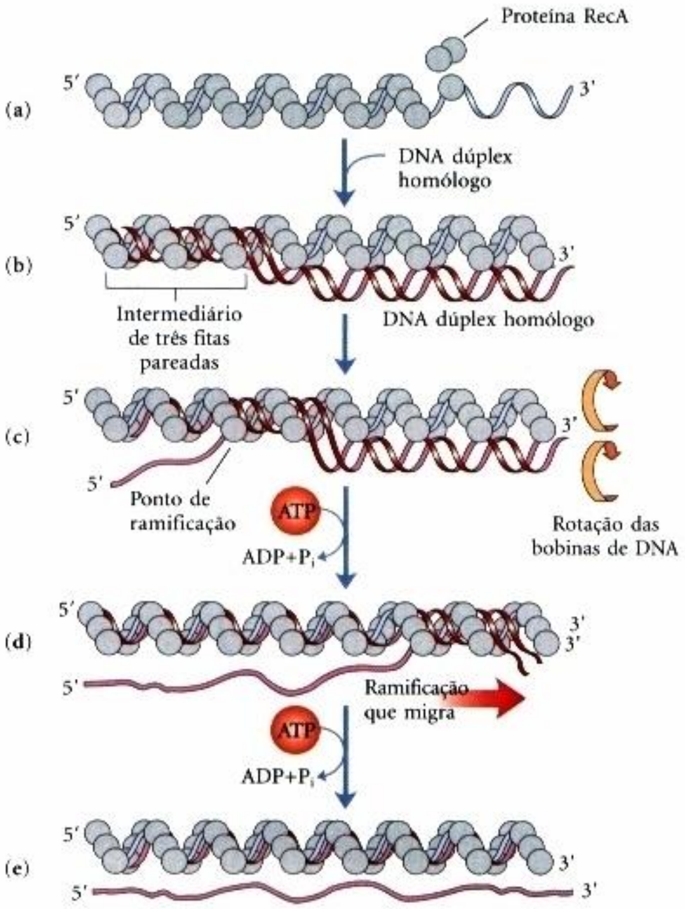
Assim que um intermediário Holliday é formado, uma multidão de enzimas — topoisomerases, a proteína de migração da ramificação RuvAB, uma resolvase, outras nucleases, a DNA polimerase I ou III e a DNA ligase — são requeridas para completar a recombinação. A proteína RuvC (M_r 20.000) da *E. coli* cliva os intermediários Holliday para gerar pedaços inteiros de produtos cromossômicos não-ramificados.

Todos os aspectos do metabolismo do DNA reúnem-se para reparar as forquilhas de replicação paradas

Como todas as células, as bactérias carregam altos níveis de lesão do DNA, mesmo sob condições de crescimento normal. A maioria das lesões é reparada rapidamente por excisão de base, por excisão de nucleotídeo e por outras vias já descritas. Entretanto, quase toda forquilha de replicação bacteriana encontra uma lesão do DNA não-reparada ou quebra em algum ponto na sua jornada que vai da origem ao término da replicação (Fig. 25-26). A DNA polimerase III não consegue passar por muitos tipos de lesão, e esses embates tendem a deixar a lesão com uma lacuna na fita simples. Um embate com uma fita de DNA quebrada cria uma quebra da fita dupla. Ambas as situações requerem reparo de recombinação do DNA (Fig. 25-35). Sob condições normais de crescimento, as forquilhas de replicação paradas são reativadas por uma via de reparo elaborada, abarcando o reparo de recombinação do DNA, o reinício da replicação e o reparo de qualquer lesão deixada para trás. Todos os aspectos do metabolismo do DNA se reúnem nesse processo.

Uma vez que a forquilha de replicação tenha sido parada, ela pode ser restaurada por, pelo menos, duas vias principais, ambas as quais requerem a proteína RecA. A via de reparo para lesões, que contêm lacunas de DNA, também requer as proteínas RecF, RecO e RecR. O reparo de quebras de fita dupla requer a

Figura 25-34 – Modelo para a troca da fita de DNA mediada pela proteína RecA. Uma reação de três fitas é mostrada. As bolas, representando a proteína RecA, estão de tamanho menor que o normal quando comparadas à espessura do DNA, para clarificar o destino das fitas de DNA. (**a**) A proteína RecA forma um filamento na fita simples do DNA. (**b**) Um dúplex homólogo se incorpora nesse complexo. (**c**) À medida que o embobinamento desloca a região das três fitas da esquerda para a direita, uma das fitas no dúplex é transferida à fita simples originalmente ligada ao filamento. A outra fita do dúplex é deslocada e uma nova dúplex é formada dentro do filamento. À medida que a rotação continua (**d** e **e**), a fita deslocada é finalmente separada completamente. O ATP é hidrolisado pela proteína RecA durante essa troca de fita.



enzima RecBCD (Fig. 25-35b). Etapas de recombinação adicionais são seguidas por um processo chamado de reinício da replicação independente da origem, em que a forquilha de replicação é remontada com a ajuda de um complexo de sete proteínas (PriA, B e C e DnaB, C, G e T). Esse complexo, originalmente descoberto como um componente requerido para a replicação do DNA φX174 *in vitro*, é agora chamado de iniciossoma de reinício da replicação. O restauro da forquilha de replicação também requer a DNA polimerase II, um papel ainda não definido, abrindo caminho à DNA polimerase III para a replicação extensiva, geralmente requerida para completar o cromossomo.

O reparo das forquilhas de replicação paradas exige uma transição coordenada da replicação para a recombinação e de volta para a replicação. As etapas de recombinação funcionam para preencher a lacuna de DNA ou reunir o ramo de DNA quebrado para recriar a estrutura de DNA ramificada na forquilha de replicação. Lesões deixadas para trás, no que é agora um DNA dupla fita, são reparadas por vias de reparo como a excisão de base ou a excisão de nucleotídeo. Assim, uma grande variedade de enzimas, abarcando cada aspecto do metabolismo do DNA, participa no reparo de uma forquilha de replicação parada. Esse tipo de processo de reparo é claramente uma função principal do sistema de recombinação homólogo de toda célula, e defeitos no reparo de recombinação do DNA desempenham um importante papel em doenças humanas (Adendo 25-1).

A recombinação sítio-específica resulta em rearranjos precisos do DNA

A recombinação genética homóloga pode envolver duas seqüências homólogas quaisquer. A recombinação, em um tipo de processo muito diferente, é limitada a seqüências específicas. Essas reações de recombinações ocorrem em praticamente toda célula, preenchendo papéis especiais que variam muito de uma espécie para outra. Exemplos incluem a regulação da expressão de certos genes e a promoção de rearranjos de DNA programados durante o desenvolvimento embrionário ou em ciclos de replicação de alguns DNAs virais ou plasmidiais. Cada sistema de recombinação sítio-específica consiste em uma enzima chamada de recombinase e em uma seqüência curta única de DNA (de 20 a 200 pares de bases) em que a recombinase age (o sítio de recombinação). Uma ou mais proteínas auxiliares podem regular o tempo ou a saída da reação.

Estudos *in vitro* de muitos sistemas de recombinação sítio-específica elucidaram alguns princípios gerais, incluindo a via da reação fundamental (Fig. 25-36a). Uma recombinase separada reconhece e se liga a cada um de dois sítios de recombinação em diferentes moléculas de DNA ou dentro do mesmo DNA. Uma fita de DNA, em cada lado, é clivada em um ponto específico dentro do sítio, e a recombinase torna-se covalentemente ligada ao DNA no sítio de clivagem por meio de uma ligação fosfotirosina (ou fosfoserina) (etapa ①). A ligação transitória proteína-

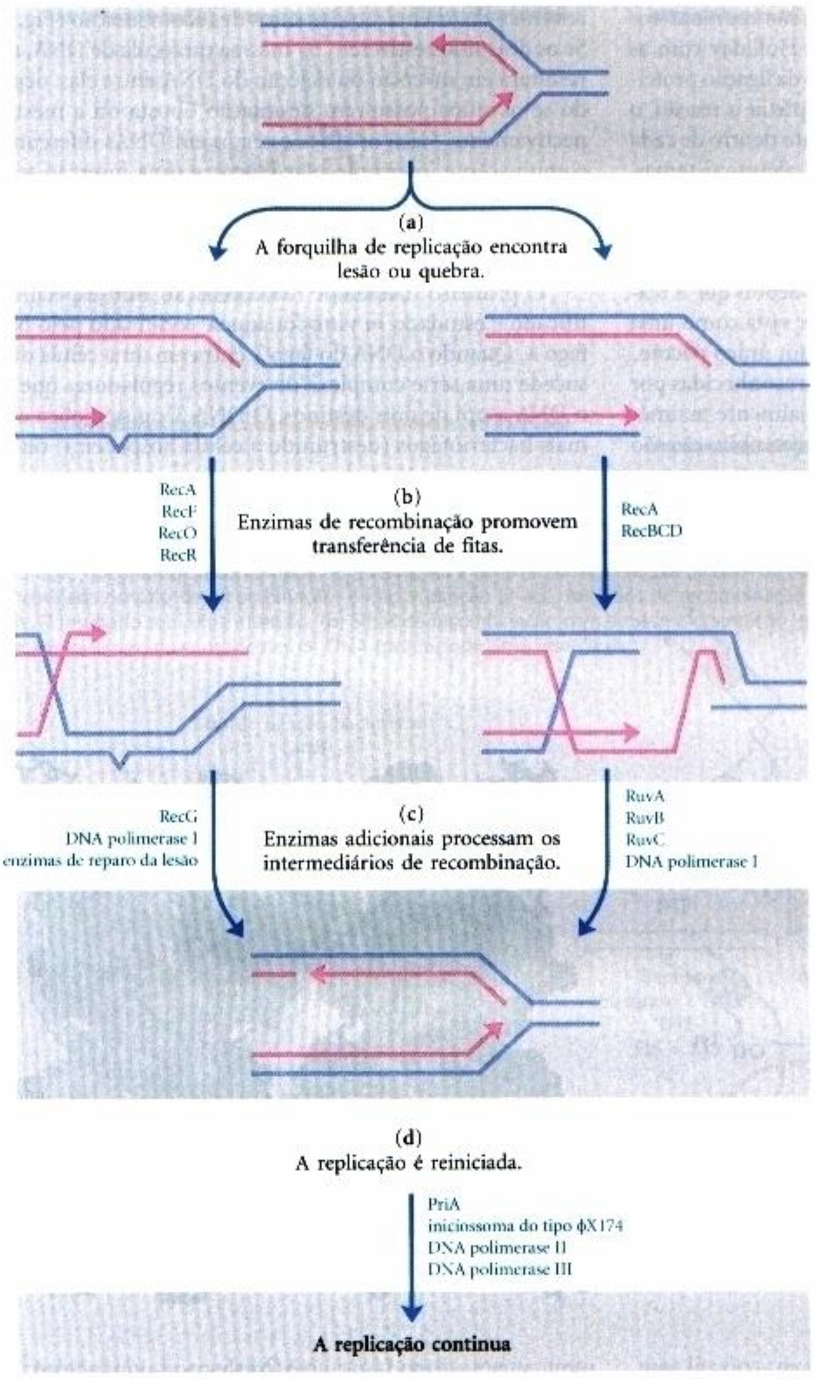
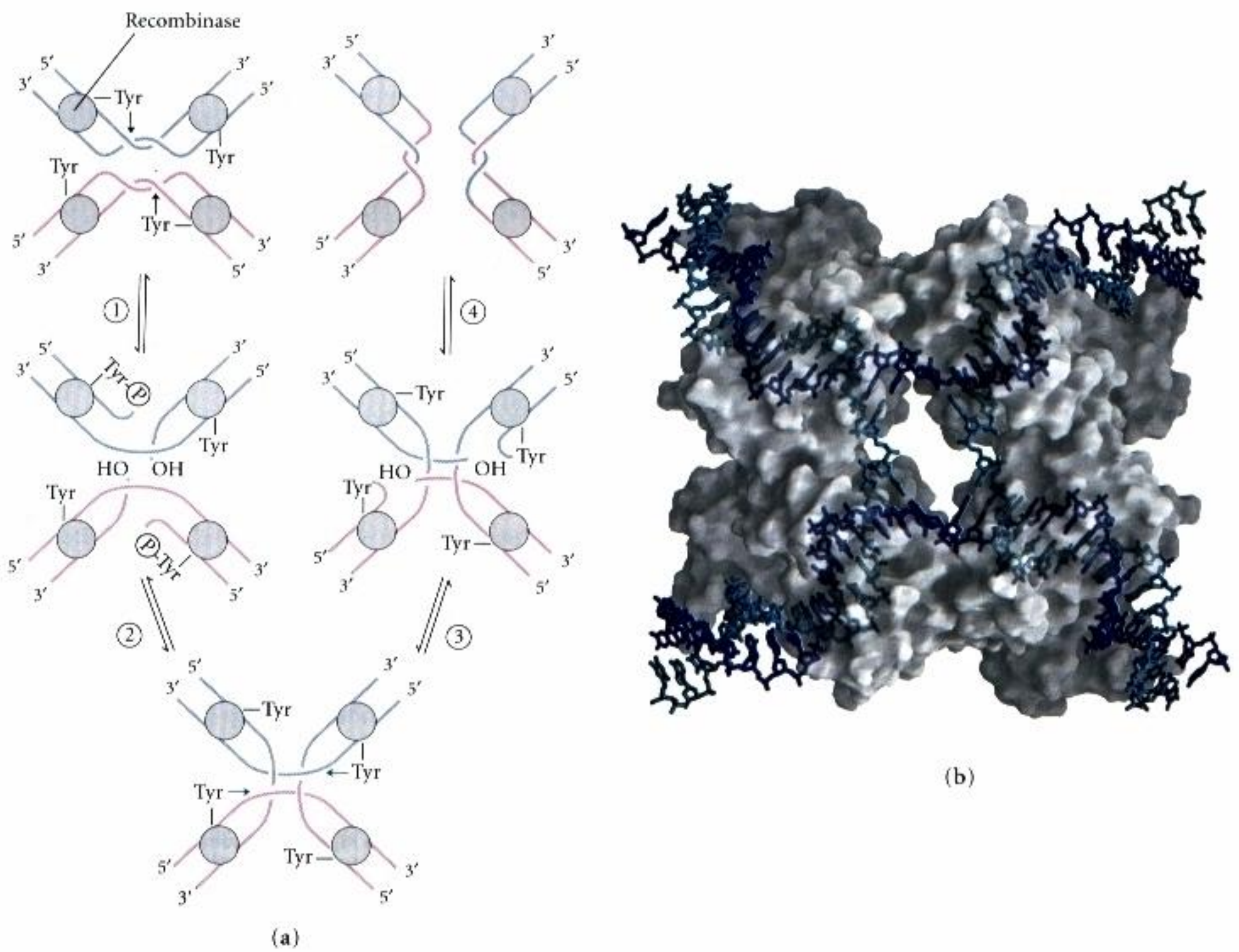

(a)
A forquilha de replicação encontra lesão ou quebra.
RecA
RecF
RecO
RecR
(b)
Enzimas de recombinação promovem transferência de fitas.
RecA
RecBCD
RecG
DNA polimerase I
enzimas de reparo da lesão
(c)
Enzimas adicionais processam os intermediários de recombinação.
RuvA
RuvB
RuvC
DNA polimerase I
(d)
A replicação é reiniciada.
PriA
iniciossoma do tipo φX174
DNA polimerase II
DNA polimerase III
A replicação continua

Figura 25-35 – Modelo para o reparo de recombinação do DNA das forquilhas de replicação paradas. (**a**) A forquilha de replicação colaba ao encontrar uma lesão de DNA (à esquerda) ou uma quebra de fita (à direita). (**b**) Enzimas de recombinação promovem a transferência da fita de DNA necessária para reparar a estrutura do DNA ramificada na forquilha de replicação. Uma lesão em uma lacuna de uma fita simples é reparada em uma reação, requerendo as proteínas RecF, RecO e RecR. Quebras de fitas duplas de DNA são reparadas em uma via, requerendo a enzima RecBCD. Ambas as vias requerem RecA. (**c**) Intermediários de recombinação são processados por enzimas adicionais (por exemplo, RuvA, RuvB e RuvC, que processam intermediários Holliday). Lesões no DNA de fita dupla são reparadas pelo reparo de excisão de nucleotídeo ou de outras vias. (**d**) A forquilha de replicação é restabelecida com a ajuda de enzimas que catalisam o reinício da replicação, independentemente da origem, e a replicação do cromossomo é completada. O processo global requer uma coordenação elaborada de todos os aspectos do metabolismo do DNA bacteriano.

DNA preserva a ligação fosfodiéster perdida na clivagem do DNA e co-fatores de alta energia, como o ATP, são desnecessários nas etapas subseqüentes. As fitas de DNA clivadas são reunidas aos novos parceiros, formando um intermediário Holliday com as novas ligações fosfodiésteres criadas às expensas da ligação proteína-DNA (etapa ② da Fig. 25-36a). Para completar a reação, o processo deve ser repetido em um segundo ponto dentro de cada sítio de recombinação (etapas ③ e ④). Em alguns sistemas, ambas as fitas de cada sítio de recombinação devem ser cortadas concomitantemente e reunidas aos novos parceiros sem o intermediário Holliday. A troca é sempre recíproca e precisa, de forma que os sítios de recombinação são regenerados depois que a reação estiver completada. A recombinase pode ser vista como uma endonuclease sítio-específica e uma ligase em um único pacote.

As seqüências dos sítios de recombinação, reconhecidas por estas recombinases sítio-específicas, são parcialmente assimétricas (não-palindrômicas), e os dois sítios de recombinação são alinhados na mesma orientação durante a reação da recombinase. A reação pode ter várias saídas, dependendo da localização relativa e da orientação dos sítios de recombinação (Fig. 25-37). Se os dois sítios estiverem na mesma molécula de DNA, a reação resultará em inversão ou deleção do DNA entre elas, dependendo se os sítios possuírem orientação oposta ou a mesma, respectivamente. Caso os sítios estejam em DNAs diferentes, a recombinação é intermolecular e ocorre uma inserção se um ou ambos os DNAs forem circulares. Alguns sistemas são altamente específicos para uma dessas reações e agem apenas em sítios com orientações particulares.

O primeiro sistema de recombinação sítio-específica identificado e estudado *in vitro* foi aquele codificado pelo bacteriófago λ. Quando o DNA do fago λ entra em uma célula da *E. coli*, sucede uma série complexa de eventos reguladores que conduz o DNA a um de dois destinos. O DNA λ ou se replica e produz mais bacteriófagos (destruindo a célula hospedeira) ou se inte-



(a)

(b)

Figura 25-36 – Uma reação da recombinação sítio-específica. (**a**) A reação mostrada é para um tipo comum de recombinases sítio-específicas chamada de recombinases da classe integrase (nomeada depois da integrase do bacteriófago λ, a primeira a ser caracterizada). A reação é realizada dentro de um tetrâmero de subunidades idênticas. As subunidades da recombinase se ligam a uma seqüência específica, freqüentemente chamada de sítio de recombinação. ① Uma fita em cada DNA é clivada em pontos especiais na seqüência. O nucleofílico é o grupo OH de um resíduo de Tyr no centro ativo, e o produto é uma ligação fosfotirosina entre a proteína e o DNA. ② As fitas quebradas se unem a novos parceiros, produzindo um intermediário Holliday. As etapas ③ e ④ completam a reação por um processo semelhante às duas primeiras etapas. A seqüência original do sítio de recombinação é regenerada, após a recombinação do DNA que flanqueia o sítio. Essas etapas ocorrem em um complexo de subunidades múltiplas da recombinase que, às vezes, inclui outras proteínas não mostradas aqui. (**b**) Modelo da superfície de contorno das quatro subunidades da recombinase da classe integrase chamada de recombinase Cre, ligada à estrutura de um intermediário de recombinação Holliday mostrado em fitas da hélice em azul-claro e azul-escuro. A proteína está representada em transparência para que o DNA ligado possa ser visualizado.

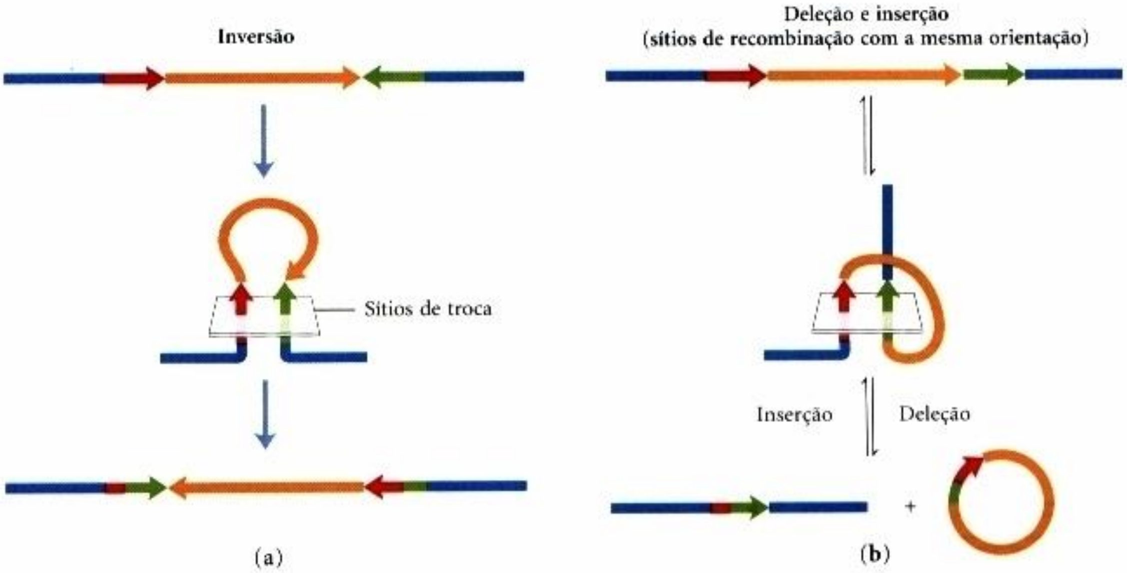


Figura 25-37 – Efeitos da recombinação sítio-específica. A conseqüência da recombinação sítio-específica depende da localização e da orientação dos sítios de recombinação (em vermelho e azul) em uma molécula de DNA de fita dupla. A orientação aqui se refere à ordem dos nucleotídeos no sítio de recombinação, e não à direção 5'→3'. (**a**) Sítios de recombinação com orientação oposta na mesma molécula de DNA. O resultado será uma inversão. (**b**) Sítios de recombinação com a mesma orientação, quer em uma molécula de DNA (produzindo uma deleção), quer em duas moléculas de DNA (produzindo uma inserção).

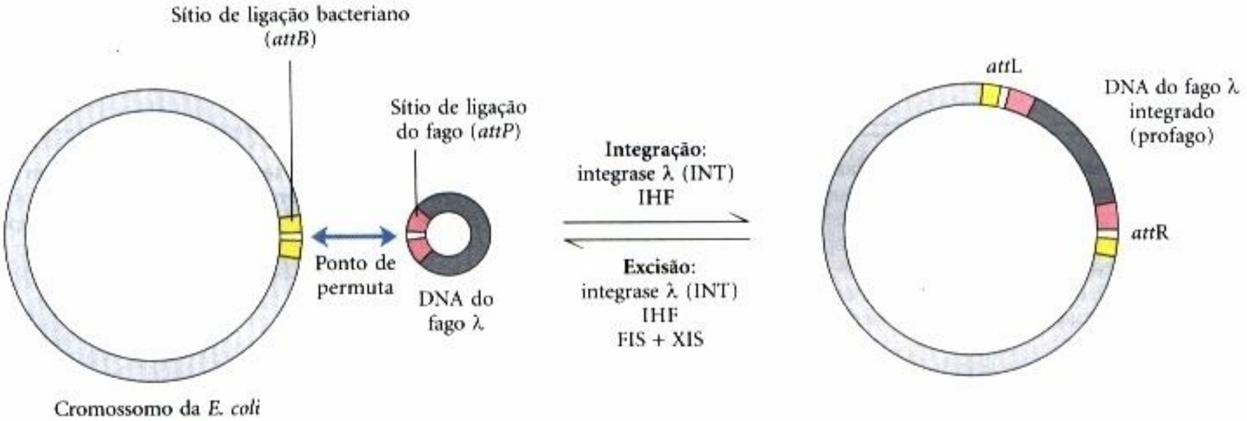


Figura 25-38 – Integração e excisão do DNA do bacteriófago λ no sítio-alvo cromossômico. O sítio de ligação no DNA do fago λ (*att*P) compartilha apenas 15 pares de bases de homologia completa com o sítio bacteriano (*att*B) na região da permuta. A reação gera dois novos sítios de ligação (*att*R e *att*L), flanqueando o DNA do fago integrado. A recombinase é a integrase λ (ou proteína INT). A integração e a excisão usam sítios de ligação distintos e proteínas auxiliares diferentes. A excisão usa as proteínas XIS, codificadas pelo bacteriófago, e FIS, codificada pela bactéria. Ambas as reações requerem a proteína IHF ("*integration host factor*", ou fator de integração do hospedeiro), codificada pela bactéria.

gra no cromossomo hospedeiro, replicando passivamente junto ao cromossomo, por muitas gerações. A integração é realizada por uma recombinase codificada pelo fago (integrase λ) que age em sítios de recombinação nos DNAs do fago e da bactéria, chamados de sítios de ligação *att*P e *att*B, respectivamente (Fig. 25-38).

O papel da recombinação sítio-específica na regulação da expressão gênica é considerada no Capítulo 28.

A replicação completa do cromossomo pode requerer a recombinação sítio-específica

O reparo do DNA recombinacional de um cromossomo circular bacteriano, embora essencial, às vezes, gera subprodutos deletérios. A resolução de uma junção Holliday, na forquilha de replicação, por uma nuclease como a RuvC, seguida pelo término da replicação, pode dar origem a um ou dois subprodutos: os dois cromossomos monoméricos usuais ou um cromossomo dimérico contíguo (Fig. 25-39). No último caso, os cromossomos ligados covalentemente não conseguem se segregar nas células filhas na divisão celular, e as células divididas se tornam "grudadas". Um sistema de recombinação sítio-específica especializado na *E. coli*, chamado de sistema XerCD, converte os cromossomos diméricos em cromossomos monoméricos de forma que a divisão celular pode prosseguir. A reação é uma deleção sítio-específica (Fig. 25-37b). Esta é um outro exemplo da íntima coordenação entre o processo de recombinação do DNA e outros aspectos do metabolismo do DNA.

Elementos genéticos transponíveis se movem de uma localização para outra

Consideraremos agora como a recombinação permite a movimentação de elementos transponíveis ou **transposons**. Esses são segmentos de DNA encontrados virtualmente em todas as células, que se movem ou "saltam" de um local em um cromossomo (o sítio doador) para outro no mesmo ou em outro cromossomo

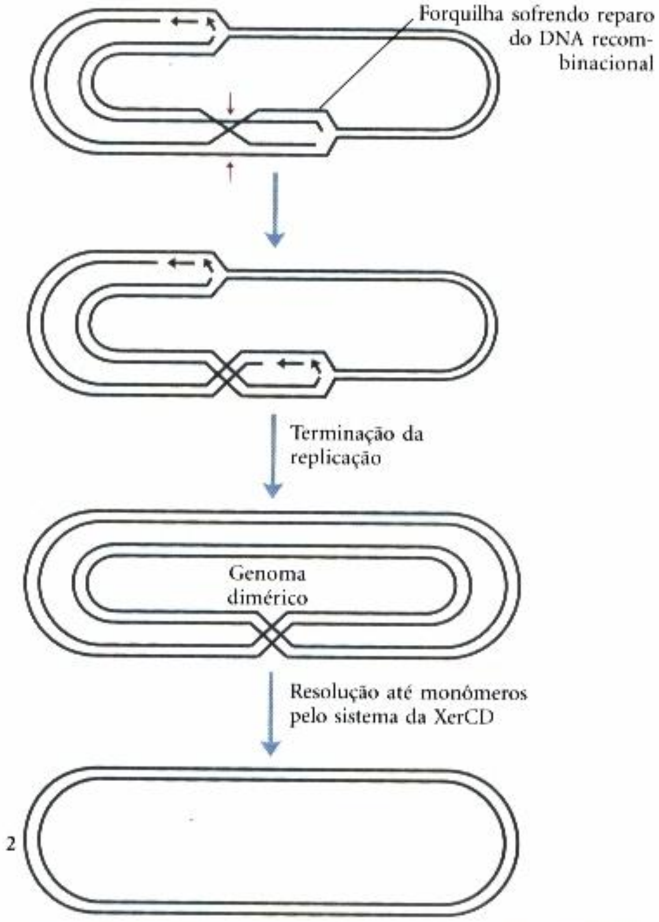

Forquilha sofrendo reparo do DNA recombinacional
Terminação da replicação
Genoma dimérico
Resolução até monômeros pelo sistema da XerCD
2

Figura 25-39 – Deleção do DNA para desfazer um efeito deletério do reparo de recombinação do DNA. A resolução de um intermediário de Holliday, durante o reparo de recombinação do DNA, pode (se cortado nos pontos indicados pelas setas vermelhas) gerar um cromossomo dimérico contíguo. Uma recombinase sítio-específica especializada da *E. coli*, chamada de XerCD, converte o dímero em monômeros, permitindo o prosseguimento da segregação do cromossomo e da divisão celular.

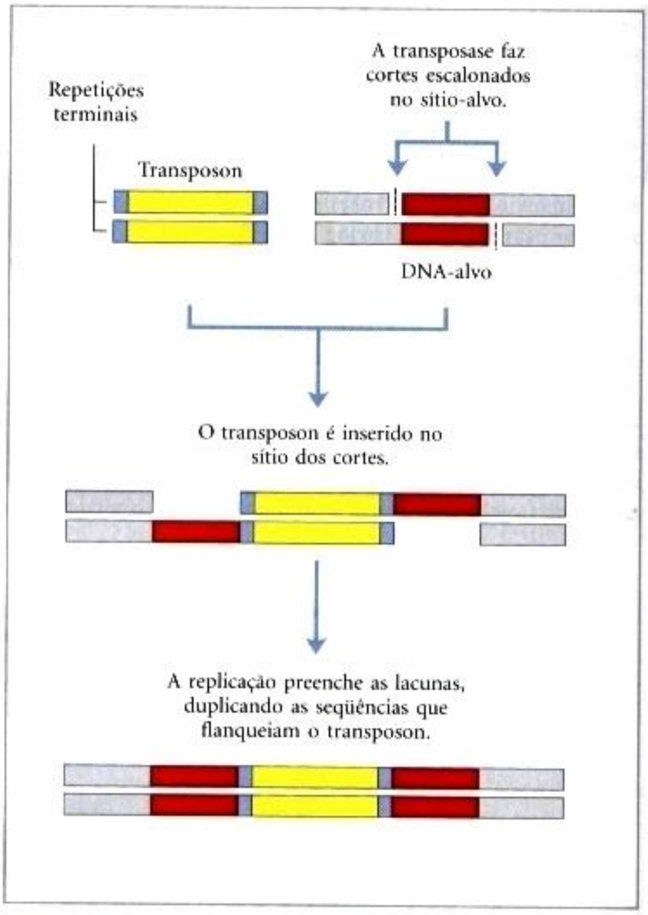

Repetições terminais
A transposase faz cortes escalonados no sítio-alvo.
Transposon
DNA-alvo
O transposon é inserido no sítio dos cortes.
A replicação preenche as lacunas, duplicando as seqüências que flanqueiam o transposon.

Figura 25-40 – Duplicação da seqüência de DNA em um sítio-alvo quando um transposon é inserido. As seqüências duplicadas são mostradas em vermelho. Essas seqüências são, geralmente, de apenas uns poucos pares de bases de comprimento, de forma tal que seu tamanho (comparado àquele de um transposon típico) está muito exagerado neste esquema.

(sítio-alvo). A homologia de seqüência no DNA não é usualmente requerida para esse movimento, chamado de **transposição**; a nova localização é escolhida, mais ou menos, aleatoriamente. A inserção de um transposon em um gene essencial poderia matar uma célula, dessa forma, a transposição é fortemente regulada e usualmente muito infreqüente. Os transposons são talvez os mais simples dos parasitas moleculares, adaptados a replicar passivamente dentro do cromossomos das células hospedeiras. Em alguns casos, eles carregam genes que são úteis para a célula hospedeira e existem em uma espécie de simbiose com o hospedeiro.

As bactérias possuem duas classes de transposons. **Seqüências de inserção** (transposons simples) contêm apenas as seqüências requeridas para a sua transposição e os genes para proteínas (transposases) que promovem o processo. **Transposons complexos** contêm um ou mais genes, além daqueles necessários para a transposição. Esses genes adicionais podem, por exemplo, conferir resistência aos antibióticos e, portanto, aumentar as chances de sobrevivência da célula hospedeira. O espalhamento dos elementos de resistência aos antibióticos nas populações de bactérias causadoras de doença que está tornando alguns antibióticos ineficazes (pág. 717) é mediada em parte pela transposição.

Transposons bacterianos variam em estrutura, mas a maioria possui repetições curtas, em cada extremidade, que funcionam como sítios de ligação para a transposase. Quando a transposição ocorre, uma seqüência curta no sítio-alvo (5 a 10 pares de bases) é duplicada para formar uma repetição curta adicional que flanqueia cada extremidade do transposon inserido (Fig. 25-40). Esses segmentos duplicados resultam do mecanismo de corte usado para inserir um transposon em um DNA, em uma nova localização.

Há duas vias gerais para a transposição nas bactérias. Na transposição simples ou direta (Fig. 25-41, à esquerda), cortes em cada lado do transposon excisam-no e o transposon se move para uma nova localização. Isso deixa uma quebra nas fitas duplas do DNA doador, que precisa ser reparada. No sítio-alvo, um corte alternado é feito (como na Fig. 25-40), o transposon é inserido dentro da quebra, e a replicação do DNA preenche as lacunas para duplicar a seqüência do sítio-alvo. Na transposição replicativa (Fig. 25-41, à direita), o transposon inteiro é replicado, deixando uma cópia atrás, no local do doador. O **cointegrado** é um intermediário nesse processo, consistindo da região doadora covalentemente ligada ao DNA no sítio-alvo. Duas cópias completas do transposon estão presentes nesse cointegrado, ambas tendo a mesma orientação relativa no DNA. Em alguns transposons bem caracterizados, o intermediário é convertido em produtos pela recombinação sítio-específica, em que recombinases especializadas promovem a reação de deleção requerida.

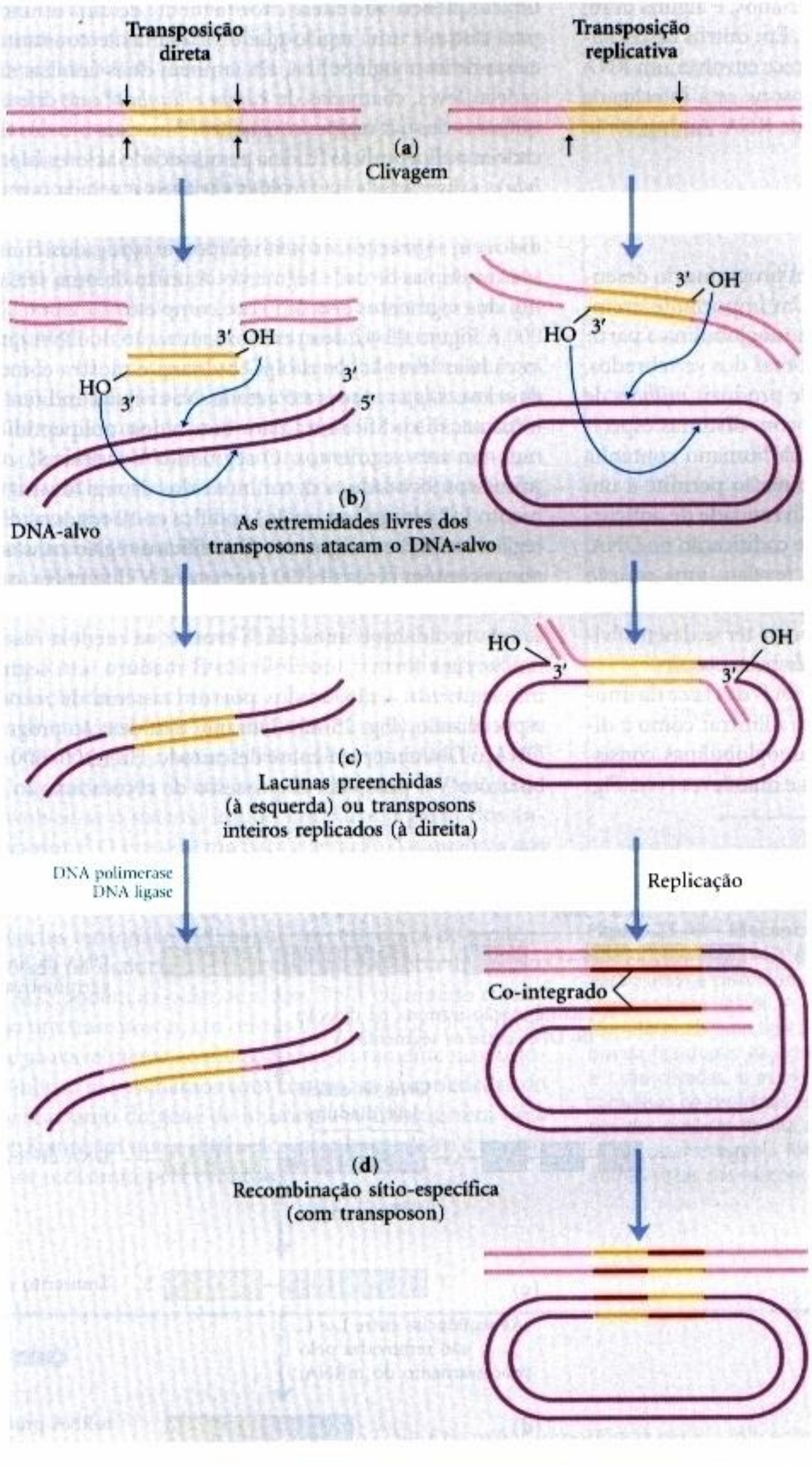

Transposição direta
Transposição replicativa
(a)
Clivagem
3′ OH
HO
3′
3′
5′
3′ OH
HO 3′
(b)
As extremidades livres dos transposons atacam o DNA-alvo
DNA-alvo
HO
3′
OH
3′
(c)
Lacunas preenchidas (à esquerda) ou transposons inteiros replicados (à direita)
DNA polimerase
DNA ligase
Replicação
Co-integrado
(d)
Recombinação sítio-específica (com transposon)

Figura 25-41 – Duas vias gerais para a transposição: direta (simples) e replicativa. (**a**) O DNA é primeiro clivado em cada lado do transposon, nos sítios indicados pelas setas. (**b**) Os grupos hidroxila 3′, liberados nas extremidades do transposon, agem como nucleófilos em um ataque direto às ligações fosfodiésteres no DNA-alvo. As ligações fosfodiésteres alvo são alternadas (e não uma acima da outra) nas duas fitas do DNA. (**c**) O transposon está agora ligado no DNA-alvo. Na transposição direta, a replicação preenche as lacunas em cada extremidade. Na transposição replicativa, o transposon inteiro é replicado, criando um intermediário co-integrado. (**d**) O co-integrado é freqüentemente resolvido depois com a ajuda de um sistema de recombinação sítio-específica separado. O DNA hospedeiro clivado, deixado atrás depois da transposição direta, é ou reparado pela junção das extremidades do DNA ou degradado (não mostrado). O último resultado pode ser letal para um organismo.

Os eucariotos também possuem transposons, estruturalmente semelhantes aos transposons bacterianos, e alguns usam mecanismos de transposição semelhantes. Em outros casos, entretanto, o mecanismo de transposição parece envolver um RNA intermediário. A evolução desses transposons está interligada com a evolução de certas classes de vírus de RNA. Ambos serão descritos no próximo capítulo.

Os genes da imunoglobulina são montados por recombinação

Alguns rearranjos do DNA são parte de um programa do desenvolvimento nos organismos eucariotos. Um importante exemplo é a geração dos genes completos de imunoglobulina a partir de segmentos de genes separados nos genomas dos vertebrados. Um mamífero, como o homem, é capaz de produzir *milhões* de imunoglobulinas (anticorpos) diferentes, com distintas especificidades de ligação, mesmo que o genoma humano contenha apenas cerca de 100.000 genes. A recombinação permite a um organismo produzir uma extraordinária diversidade de anticorpos a partir de uma capacidade limitada de codificação no DNA. Estudos do mecanismo de recombinação revelam uma relação estreita com a transposição do DNA e sugerem que esse sistema de geração da diversidade dos anticorpos possa ter se desenvolvido a partir de uma invasão celular antiga de transposons.

Os genes humanos, que codificam proteínas da classe da imunoglobulina G (IgG), podem ser usados para ilustrar como a diversidade dos anticorpos é gerada. As imunoglobulinas consistem de duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas leves (veja Fig. 7-23). Cada cadeia possui duas regiões, uma região variável, com uma seqüência que difere enormemente de uma imunoglobulina para outra, e uma região que é virtualmente constante em uma classe de imunoglobulina. Há também duas famílias distintas de cadeias leves, chamadas de *káppa* e *lámbda*, que diferem nas seqüências de suas regiões constantes. Para cada um dos três tipo de cadeias polipeptídicas (cadeia pesada e cadeias leves *káppa* ou *lámbda*), a diversidade nas regiões variáveis é gerada por um mecanismo semelhante. Os genes para esses polipeptídeos estão divididos em segmentos, e o genoma possui agregados, contendo versões múltiplas de cada segmento. A união de uma versão de cada um dos segmentos cria um gene completo.

A Figura 25-42 descreve a organização do DNA que codifica as cadeias leves *káppa* da IgG humana e mostra como uma cadeia leve *káppa* madura é gerada. Nas células indiferenciadas, a informação codificadora para essa cadeia polipeptídica é separada em três segmentos. O segmento V (variável) codifica os primeiros 95 resíduos de aminoácidos da região variável, o segmento J ("*joining*", ou união) codifica os 12 resíduos restantes da região variável e o segmento C codifica a região constante. O genoma contém cerca de 300 segmentos V diferentes, quatro segmentos J diferentes e um segmento C.

À medida que uma célula-tronco na medula óssea se diferencia para formar um linfócito B maduro, um segmento V e um segmento J são unidos por um sistema de recombinação especializado (Fig. 25-42). Durante essa deleção programada do DNA, o DNA interveniente é descartado. Há 1.200 (300 × 4) combinações V-J possíveis. O processo de recombinação não é tão

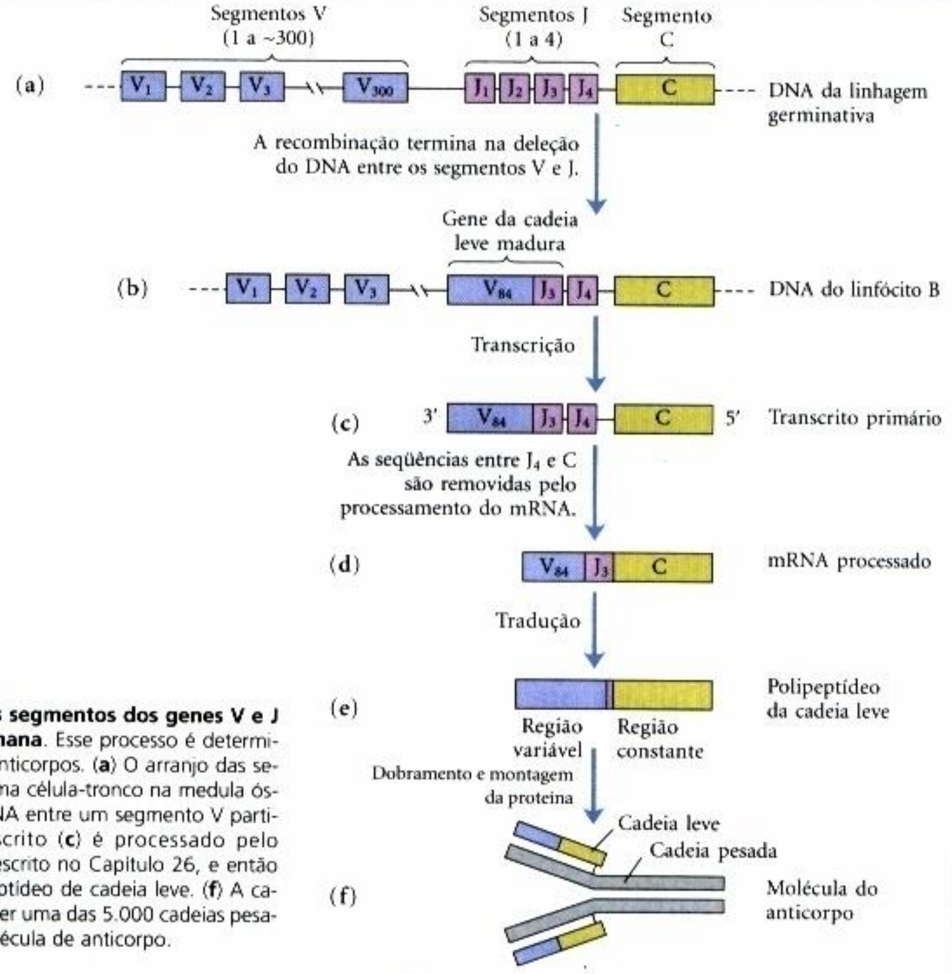

Segmentos V
(1 a ~300)
Segmentos J
(1 a 4)
Segmento
C
(a)
V_1
V_2
V_3
V_{300}
J_1
J_2
J_3
J_4
C
DNA da linhagem germinativa
A recombinação termina na deleção do DNA entre os segmentos V e J.
Gene da cadeia leve madura
(b)
V_1
V_2
V_3
V_{84}
J_3
J_4
C
DNA do linfócito B
Transcrição
(c)
3'
V_{84}
J_3
J_4
C
5'
Transcrito primário
As seqüências entre J_4 e C são removidas pelo processamento do mRNA.
(d)
V_{84}
J_3
C
mRNA processado
Tradução
(e)
Polipeptídeo da cadeia leve
Região variável
Região constante
Dobramento e montagem da proteína
Cadeia leve
Cadeia pesada
(f)
Molécula do anticorpo

Figura 25-42 – Recombinação dos segmentos dos genes V e J da cadeia *káppa* leve da IgG humana. Esse processo é determinado para gerar a diversidade dos anticorpos. (**a**) O arranjo das seqüências codificadoras da IgG em uma célula-tronco na medula óssea. (**b**) A recombinação deleta o DNA entre um segmento V particular e um segmento J. O transcrito (**c**) é processado pelo processamento do RNA (**d**) como descrito no Capítulo 26, e então traduzido (**e**) para produzir o polipeptídeo de cadeia leve. (**f**) A cadeia leve pode combinar com qualquer uma das 5.000 cadeias pesadas possíveis para produzir uma molécula de anticorpo.

preciso como a recombinação sítio-específica descrita anteriormente. Uma variação adicional na seqüência ocorre na junção V-J, o que aumenta a variação global por um fator de, pelo menos, 2,5: cerca de 3.000 (2,5 × 1.200) diferentes combinações V-J podem ser geradas.

A união final dessa combinação V-J à região C é acompanhada por uma reação de processamento do RNA depois da transcrição, um processo descrito no Capítulo 26. Os genes para as cadeias pesadas e as cadeias leves *lâmbda* são formados de maneira semelhante. Para as cadeias pesadas, há mais segmentos gênicos e mais de 5.000 combinações possíveis. Pelo fato de qualquer cadeia pesada poder combinar-se com qualquer cadeia leve para gerar uma imunoglobulina, cada homem possui pelo menos 3.000 × 5.000 ou $1,5 \times 10^7$ IgGs possíveis. A diversidade adicional é gerada pelo fato de as seqüências V estarem sujeitas a altas taxas de mutação (de mecanismo desconhecido) durante a diferenciação do linfócito B. Cada linfócito B maduro produz apenas um tipo de anticorpo, mas a variedade de anticorpos produzidos pelas diferentes células é enorme.

O mecanismo de recombinação para unir os segmentos V e J é ilustrado na Figura 25-43. Após cada segmento V e antes de cada segmento J, estão as seqüências sinais de recombinação (RSS — "*r*ecombination *s*ignal *s*equences"). Elas são ligadas a proteínas chamadas de RAG1 e RAG2 ("*r*ecombination *a*ctivating *g*ene", ou genes de ativação da recombinação). As proteínas RAG catalisam a formação de uma quebra de fitas duplas entre as seqüências sinais e os segmentos V (ou J) a serem unidos. Os segmentos V e J são então unidos com a ajuda de um segundo complexo de proteínas.

Desenvolveu-se o sistema imune, em parte, a partir dos antigos transposons? O mecanismo para a geração das quebras das fitas duplas pela RAG1 e RAG2 espelha várias etapas de reações na transposição (Fig. 25-43). Além disso, o DNA eliminado, com suas seqüências terminais RSS, possui um estrutura de seqüência encontrada na maioria dos transposons. No tubo de ensaio, RAG1 e RAG2 podem associar-se a esse DNA eliminado e inseri-lo, como um transposon, em outras moléculas de DNA (uma reação que provavelmente acontece apenas raramente nos linfócitos B). Embora não saibamos com certeza, as propriedades do sistema de rearranjo do gene da imunoglobulina sugerem uma origem intrigante em que a distinção entre hospedeiro e parasita tornou-se indistinta pela evolução.

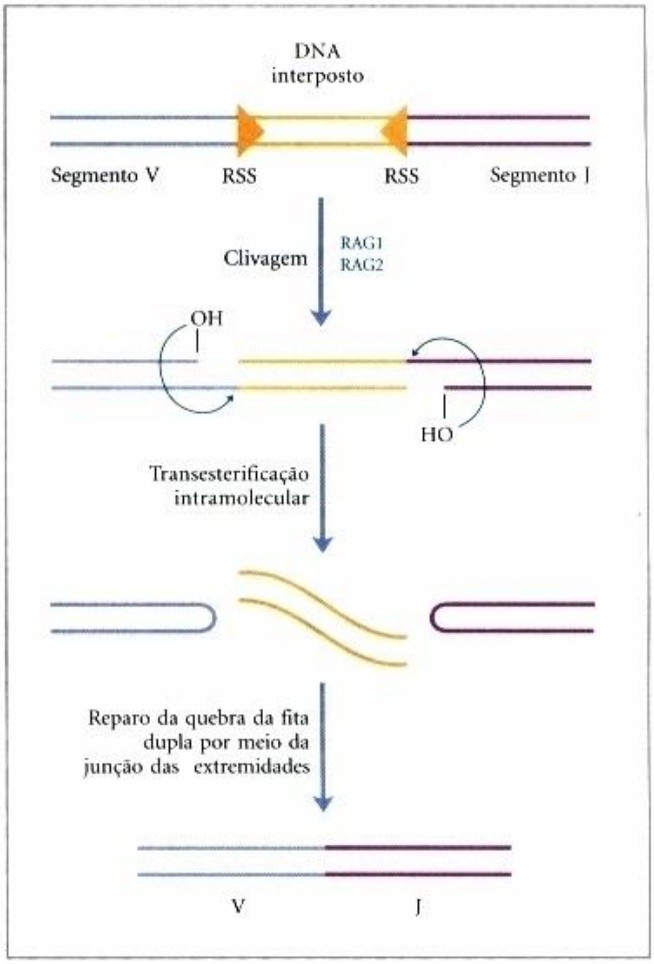


Figura 25-43 – Mecanismo do rearranjo do gene da imunoglobulina. As proteínas RAG1 e RAG2 se ligam a seqüências sinais de recombinação (RSS) e clivam uma fita de DNA entre o RSS e os segmentos de V (ou J) a serem unidos. A hidroxila 3′ liberada então age como um nucleófilo, atacando uma ligação fosfodiéster na outra fita para criar uma quebra da fita dupla. As extremidades grampo resultantes nos segmentos V e J são clivadas, e as extremidades são ligadas covalentemente por um complexo de proteínas especializado no reparo de união das extremidades das quebras da fita dupla. As etapas na geração da quebra da fita dupla catalisada pela RAG1 e RAG2 são quimicamente relacionadas às etapas vistas nas reações de transposição.

Resumo

A integridade do DNA é da maior importância para a célula, como mostram a complexidade e redundância dos sistemas enzimáticos que participam na replicação do DNA, reparo e recombinação e a energia que esses sistemas requerem.

A replicação do DNA ocorre com uma fidelidade muito alta e dentro de um período de tempo designado no ciclo celular. A replicação é semiconservativa, com cada fita agindo como um molde para uma nova fita filha. A reação começa em uma seqüência de DNA chamada de origem e usualmente prossegue bidirecionalmente. O DNA é sintetizado na direção 5′→3′ pela DNA polimerase. Na forquilha de replicação, a fita líder é sintetizada continuamente na mesma direção em que a forquilha de replicação progride. A fita atrasada é sintetizada descontinuamente como fragmentos de Okazaki, que são subseqüentemente ligados. A fidelidade da replicação do DNA é mantida (1) pela seleção de bases pela polimerase, (2) por uma atividade exonuclease 3′→5′ revisora, que é parte da maioria das DNA polimerases e (3) por um sistema de reparo específico para os despareamentos deixados para trás depois da replicação.

A maioria das células possui várias DNA polimerases. Na *E. coli*, a DNA polimerase III é a enzima principal da replicação. A DNA polimerase I é responsável por funções especiais durante a replicação, recombinação e reparo. A replicação do cromossomo da *E. coli* envolve muitas enzimas e fatores protéicos organizados em complexos. A iniciação da replicação requer a ligação da proteína DnaA à origem, a separação das fitas e a entrada das proteínas DnaB e DnaC para estabelecer duas forquilhas de replicação. A iniciação é a única fase da replicação que é regulada. O processo de alongamento possui diferentes requerimentos para cada fita. As fitas do DNA são separadas pela helicase DnaB, com a tensão topológica resultante aliviada pelas topoisomerases, e as fitas simples do DNA ligadas a proteínas que estabilizam as fitas separadas. Na síntese da fita atrasada, a DnaG iniciase se liga à DnaB em intervalos regulares e sintetiza iniciadores curtos de RNA. Tanto a fita líder como a atrasada são sintetizadas pela DNA polimerase III, e as sínteses são acopladas. Os RNA iniciadores são removidos e substituídos por DNA pela DNA polimerase I, e os cortes são selados pela DNA ligase. A síntese do DNA é terminada em sítios especializados em um cromossomo bacteriano e requer várias proteínas, incluindo as topoisomerases. A replicação é semelhante nas células eucarióticas, entretanto os cromossomos eucarióticos possuem origens múltiplas de replicação. Várias DNA polimerases eucarióticas foram identificadas.

As células possuem sistemas múltiplos para o reparo do DNA. O reparo dos despareamentos na *E. coli* é direcionado pela submetilação transitória das seqüências (5′)GATC nas fitas recém-sintetizadas depois da replicação. Outros sistemas reconhecem e reparam a lesão causada por agentes ambientais, como a radiação, e agentes alquilantes e a lesão causada por reações espontâneas dos nucleotídeos. Alguns sistemas de reparo reconhecem e excisam apenas as bases lesadas ou incorretas, deixando um sítio AP (apurínico ou apirimidínico) no DNA. Isso é reparado por excisão e substituição do segmento de DNA, contendo o sítio AP. Outro sistema de reparo de excisão reconhece e remove uma variedade de lesões volumosas e os dímeros de pirimidina. Alguns tipos de lesão do DNA podem também ser reparados pela reversão direta da reação que causa a lesão: dímeros de pirimidina são convertidos diretamente às pirimidinas monoméricas pela fotoliase e o grupo metila na O^6-metilguanina é removido por uma metiltransferase específica. O reparo sujeito a erros é um processo de replicação especializado e mutagênico que ocorre quando a lesão do DNA é tão importante que a necessidade das células de replicar ultrapassa a necessidade de se evitar erros.

As seqüências de DNA são rearranjadas em reações de recombinação, usualmente em processos fortemente coordenados com a replicação ou reparo do DNA. A recombinação genética homóloga ocorre entre quaisquer dos dois DNAs que compartilham homologia de seqüência. Na meiose (nos eucariotos), ela é um dos processos que criam a diversidade genética. A recombinação homóloga também é necessária para reparar alguns tipos de lesão do DNA. Um intermediário Holliday, uma permutação entre as fitas de dois DNAs homólogos é formado durante o processo. Na *E. coli*, a proteína RecA promove tanto a formação dos intermediários Holliday quanto a migração da ramificação para estender o DNA heterodúplex.

A recombinação sítio-específica ocorre apenas em seqüências-alvo específicas e esse processo pode também envolver um intermediário Holliday. As recombinases clivam o DNA em pontos específicos e ligam as fitas a novos parceiros. Esse tipo de recombinação é encontrado em praticamente todas as células, e suas muitas funções incluem a integração do DNA e a regulação da expressão gênica. Em praticamente todas as células, pequenos segmentos de DNA, chamados de transposons, usam a recombinação para se mover dentro ou entre os cromossomos. Uma reação de recombinação programada relacionada à transposição une segmentos de genes da imunoglobulina para formar genes da imunoglobulina durante a diferenciação do linfócito B em vertebrados.

Leitura Adicional

Geral

Kornberg A & Baker TA. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma fonte primária excelente para todos os aspectos do metabolismo do DNA.

Friedberg EC, Walker GC, & Siede W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Um tratamento perfeito e um bom lugar para iniciar a exploração desse campo.

Replicação

Burgers PMJ. (1998) Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* **107**, 218-227.

Crooke E. (1995) Regulation of chromosomal replication in *E.coli*: sequestration and beyond. *Cell* **82**, 877-880.

Goodman MF. (1997) Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10.493-10.495.

Goodmann MF & Fygenson KD. (1998) DNA polymerase fidelity: from genetics toward a biochemical understanding. *Genetics* **148**, 1475-1482.

Kamada K, Horiuchi T, Ohsumi K, Shimamoto N, & Morikawa K. (1996) Structure of a replication-terminator protein complexed with DNA. *Nature* **383**, 598-603.

Kelman Z & O'Donnell M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev. Biochem.* **64**, 176-200.

Marians KJ. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 673-719.

Stillman B. (1996) Cell cycle control of DNA replication. *Science* **274**, 1659-1664.

Toyn JH, Toone MW, Morgan BA, & Johnston LH. (1995) The activation of DNA replication fork in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 70-73.

Waga S, & Stillman B. (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev.Biochem.* **67**, 721-751.

Woodgate R. (1999) A plethora of lesion-replicating DNA polymerases. *Genes Develop.* **13**, 2191-2195.

Reparo

Kolodner RD. (1995) Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 397-401.

McCullough AK, Dodson ML, & Lloyd RS. (1999) Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu. Rev. Biochem.* **68, 255-286.**

Modrich P & Lahue R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 101-133.

Sancar A. (1994) Mechanisms of DNA excision repair. *Science* **266**, 1954-1956.

Sancar A. (1995) DNA repair in humans. *Annu Rev. Genet.* **29**, 69-105.

Sancar A. (1996) DNA excision repair. *Annu Rev. Biochem.* **65**, 43-81.

Seeberg E, Eide L & Bjoras M. (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 391-397.

Walker GC. (1995) SOS-regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 416-420.

Wood RD. (1996) DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 135-167.

Recombinação

Cox MM. (1999) Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **63**, 311-366.

Craig NL. (1995) Unity in transposition reactions. *Science* **270**, 253-254.

Eggleston AK & West SC. (1996) Exchanging partners: recombination in *E. coli*. *Trends Genet.* **12**, 20-26.

Grindley ND. (1997) Site-specific recombination: synapsis and strand exchange revealed. *Curr. Biol.* 7, R608-R612.

Hallet B & Sherratt DJ. (1997) Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 157-178.

Kogoma T. (1996) Recombination by replication. *Cell* **85**, 625-627.

Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, & Rehrauer WM. (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **58, 401-465.**

Lewis SM & Wu GE. (1997) The origins of V(D) J recombination. *Cell* **88**, 159-162.

Lieber M. (1996) Immunoglobulin diversity: rearranging by cutting and repairing. *Curr. Biol.* **6**, 134-136.

Pâques F & Haber JE. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349-404.

Roca AI & Cox MM. (1997) RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **56**, 129-223.

Roth DB & Craig NL. (1998) VDL recombination: a transposase goes to work. *Cell* **94**, 411-414.

Problemas

1. Conclusões do experimento de Meselson-Stahl. O experimento de Meselson-Stahl (veja Fig. 25-2) provou que o DNA realiza replicação semiconservativa na *E. coli*. No modelo "dispersivo" da replicação do DNA, as fitas de DNA parentais são clivadas em peças de tamanho aleatório e são, então, unidas com pedaços de DNA recém-replicado para produzir filhas dúplice. No modelo de Meselson-Stahl, cada fita conteria segmentos aleatórios de DNA leve e pesado. Explique como os resultados do experimento de Meselson-Stahl descartaram tal modelo.

2. Análise do isótopo pesado na replicação do DNA. Uma cultura de *E. coli*, crescendo em um meio contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, é trocada para um meio contendo $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ por três gerações (um aumento de oito vezes na população). Qual é a razão molar do DNA híbrido (^{15}N-^{14}N) para o DNA leve (^{14}N-^{14}N) nesse ponto?

3. Replicação do cromossomo da *E. coli*. O cromossomos da *E. coli* contêm 4.639.221 pares de bases.

(a) Quantas voltas da dupla hélice devem ser desenroladas durante a replicação do cromossomo da *E. coli*?

(b) A partir dos dados neste capítulo, quanto demoraria para se replicar o cromossomo da *E. coli* a 37°C, se as duas forquilhas de replicação começassem a partir da origem? Assuma que a replicação ocorra em uma velocidade de 1.000 pares de bases por segundo. Sob algumas condições, as células da *E. coli* podem dividir-se a cada 20 minutos. Como isso seria possível?

(c) Na replicação do cromossomo da *E. coli*, quantos pedaços de Okazaki seriam formados? Que fatores garantem que os numerosos fragmentos de Okazaki são montados na ordem correta no novo DNA?

4. Composição de bases dos DNAs sintetizados a partir de moldes de fitas simples. Prediga a composição de bases que você esperaria no DNA total sintetizado pela DNA polimerase em moldes fornecidos por uma mistura eqüimolecular das duas fitas complementares do DNA do bacteriófago circular ϕX174 (uma molécula circular). A composição de base de uma fita é A, 24,7%; G, 24,1%; C, 18,5% e T, 32,7%. Que suposição é necessária para responder a esse problema?

5. Replicação do DNA. Kornberg e colaboradores incubaram extratos solúveis da *E. coli* com uma mistura de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, todos marcados com ^{32}P no grupo fosfato α. Depois de um tempo, a mistura de incubação foi tratada com ácido tricloroacético, que precipita o DNA, mas não os nucleotídeos precursores. O precipitado foi coletado, e o grau da incorporação do precursor no DNA foi determinado a partir da quantidade de radioatividade presente no precipitado.

(a) Se qualquer um dos quatro nucleotídeos precursores fosse omitido da mistura de incubação, seria encontrada radioatividade no precipitado? Explique.

(b) O ^{32}P seria incorporado no DNA se apenas o dTTP fosse marcado? Explique.

(c) A radioatividade seria encontrada no precipitado se o ^{32}P marcasse os fosfatos β e γ em vez do fosfato α dos desoxirribonucleotídeos? Explique.

6. As fitas líder e atrasada. Prepare uma tabela que liste os nomes e compare as funções dos precursores, das enzimas e de outras proteínas necessárias para fazer as fitas atrasada e líder durante a replicação na *E. coli*.

7. Função da DNA ligase. Algumas mutações da *E. coli* contêm a DNA ligase defeituosa. Quando essas mutações são expostas à timidina marcada com ^{3}H e o produto for sedimentado em um gradiente alcalino de sacarose, aparecem duas bandas. Uma corresponde a uma fração de alto peso molecular, e a outra, a uma fração de peso molecular baixo. Explique.

8. Fidelidade da replicação do DNA. Que fatores promoveriam a fidelidade da replicação durante a síntese da fita líder do DNA? Você esperaria que a fita atrasada fosse feita com a mesma fidelidade? Ofereça razões para as suas respostas.

9. A importância das topoisomerases na replicação do DNA. O desenrolamento do DNA, tal como o que ocorre na replicação, afeta a densidade super-helicoidal do DNA. Na ausência das topoisomerases, o DNA se tornaria superenrolado na frente da forquilha de replicação, à medida que ele se desenrolasse atrás dela. Uma forquilha de replicação bacteriana pararia quando a densidade super-helicoidal (σ), do DNA à frente das forquilhas, alcançasse +0,14 (veja Capítulo 24).

A replicação bidirecional é iniciada na origem de um plasmídio de 6.000 pares de bases *in vitro*, na ausência das topoisomerases. O plasmídio inicialmente possui uma σ de −0,06. Quantos pares de bases serão desenrolados e replicados para cada forquilha de replicação, antes que ela pare? Assuma que cada forquilha desloque-se com a mesma velocidade e que cada uma inclua todos os componentes necessários para o alongamento exceto a topoisomerase.

10. O teste de Ames. Em um meio nutriente que não tenha histidina, uma camada fina de ágar, contendo cerca de 10^9 auxotrofos para histidina da *Salmonella typhimurium* (células mutantes que requerem histidina para sobreviver), produz cerca de 13 colônias depois de um período de 2 dias de incubação a 37°C (veja Fig. 25-18). Como essas colônias surgiram na ausência de histidina? O experimento é repetido na presença de 0,4μg de 2-aminoantraceno. O número de colônias produzido nos 2 dias excede 10.000. O que isso indicaria sobre o 2-aminoantraceno? O que você pensaria sobre sua capacidade carcinogênica?

11. Mecanismos de reparo do DNA. As células dos vertebrados e das plantas freqüentemente metilam a citosina do DNA para formar a 5-metilcitosina (veja Fig. 10-5a). Nessas mesmas células, um sistema de reparo especializado reconhece o despareamento G–T e o repara para o par de bases G≡C. Como poderia esse sistema de reparo ser vantajoso para a célula? (Explique em termos da presença da 5-metilcitosina no DNA.)

12. Reparo do DNA em pessoas com o xeroderma pigmentoso. A condição conhecida como xeroderma pigmentoso (XP) surge de mutações em, pelo menos, sete genes humanos diferentes. As deficiências são geralmente em genes que codificam enzimas envolvidas em alguma parte da via para o reparo de excisão de nucleotídeo no homem. Os vários tipos de XP são marcados como A–G (XP-A, XP-B, etc.), com algumas variantes adicionais agregadas sobre a marcação XP-V.

Culturas de células de indivíduos normais e de alguns pacientes com XP-G são irradiadas com luz ultravioleta. O DNA é isolado e desnaturado e o DNA fita simples resultante é caracterizado por ultracentrifugação analítica.

(a) Amostras de fibroblastos normais mostram uma redução significativa no peso molecular médio da fita simples do DNA depois da irradiação, entretanto, amostras dos fibroblastos XP-G não mostram nenhuma redução. Como poderia ser isso?

(b) Se você assumir que um sistema de reparo por excisão de nucleotídeo estiver operando, que etapa poderia estar defeituosa nos fibroblastos desse paciente com XP-G? Explique.

13. Intermediários Holliday. Como a formação dos intermediários de Holliday na recombinação genética homóloga difere da sua formação na recombinação sítio-específica?

CAPÍTULO 26

Metabolismo do RNA

A expressão da informação em um gene normalmente envolve a produção de uma molécula de RNA transcrita a partir de um molde de DNA. Fitas de RNA e DNA podem parecer muito semelhantes à primeira vista, diferindo apenas no grupo hidroxila na posição 2′ da pentose e na substituição da uracila por timina. Entretanto, ao contrário do DNA, os RNAs, na maioria, funcionam como fitas simples. Essas fitas se dobram sobre si mesmas, com potencial para uma diversidade estrutural muito maior do que o DNA (Capítulo 10). O RNA é, portanto, adequado para uma variedade de funções celulares.

O RNA é a única macromolécula conhecida a ter funções tanto no armazenamento e transmissão da informação quanto na catálise, levando a muita especulação sobre seu possível papel como um intermediário químico essencial no desenvolvimento da vida neste planeta. A descoberta dos RNAs catalíticos, ou ribozimas, mudou a própria definição de uma enzima, estendendo-a além do domínio das proteínas.

As proteínas, entretanto, permanecem importantes para o RNA e suas funções. Dentro de uma célula moderna, todos os ácidos nucléicos, incluindo RNAs, estão complexados com proteínas. Alguns desses complexos são bem elaborados, e o RNA pode assumir papéis estruturais e catalíticos dentro de máquinas bioquímicas complicadas.

Todas as moléculas de RNA, exceto os genomas de RNA de certos vírus, são derivadas da informação permanentemente armazenada no DNA. Durante a **transcrição**, um sistema enzimático converte a informação genética de um segmento de DNA em uma fita de RNA com uma seqüência de bases complementar a uma das fitas do DNA. Três espécies principais de RNA são produzidas. O **RNA mensageiro (mRNA)** codifica a seqüência de aminoácidos de um ou mais polipeptídeos, especificados por um gene ou conjunto de genes. O **RNA de transferência (tRNA)** lê a informação codificada no mRNA e transfere o aminoácido apropriado para uma cadeia polipeptídica crescente durante a síntese de proteínas. Moléculas do **RNA ribossomal (rRNA)** são constituintes dos ribossomos, as intrincadas máquinas celulares nas quais as proteínas são sintetizadas. Muitos RNAs especializados adicionais possuem funções regulatórias e catalíticas, ou são precursores das principais classes de RNA listadas acima.

Durante a replicação, o cromossomo inteiro é normalmente copiado, entretanto a transcrição é mais seletiva. Apenas genes ou grupos de genes específicos são transcritos em um certo tempo, e algumas porções do genoma do DNA nunca são transcritas. A célula restringe a expressão da informação genética para a formação dos produtos gênicos necessários em um dado momento. Seqüências reguladoras específicas indicam o início e o fim dos segmentos de DNA a ser transcritos e designam qual fita de DNA será usada como molde. A regulação da transcrição é descrita minuciosamente no Capítulo 28.

RNA

Aqui examinaremos a síntese de RNA em um molde de DNA, o processamento pós-sintetizante e a degradação das moléculas do RNA. No processo, encontraremos muitas das funções especializadas do RNA, incluindo as funções catalíticas. Curiosamente, os substratos para as enzimas de RNA são freqüentemente outras moléculas de RNA.

Este capítulo também introduz sistemas nos quais o RNA é o molde e o DNA é o produto, em vez do contrário. As vias de informação tornam-se, dessa forma, um círculo completo, revelando que a síntese do ácido nucléico dependente de molde possui regras-padrão independentes da natureza do molde ou do produto (RNA ou DNA). Esse exame da interconversão biológica do DNA e do RNA, como transportadores de informação, conduz finalmente a uma discussão sobre a origem evolucionária da informação biológica.

Síntese de RNA Dependente de DNA

Nossa discussão a respeito da síntese do RNA começa com uma comparação entre a transcrição e a replicação do DNA (Capítulo 25). A transcrição assemelha-se à replicação, em seu mecanismo químico fundamental, sua polaridade (direção da síntese) e seu uso de um molde. Também, da mesma forma que a replicação, a transcrição possui as fases de iniciação, alongamento e terminação — embora na literatura sobre a transcrição a iniciação seja ainda dividida em fases discretas de ligação ao DNA e de iniciação da síntese de RNA. A transcrição difere da replicação pelo fato de não requerer um iniciador, e geralmente apenas segmentos limitados de uma molécula de DNA são envolvidos. Adicionalmente, dentro desses segmentos transcritos, apenas uma fita do DNA funciona como molde.

O RNA é sintetizado pelas RNA polimerases

A descoberta da DNA polimerase e sua dependência de um molde de DNA encorajou a procura de uma enzima que sintetizasse uma fita de RNA complementar a um molde de DNA. Em 1960, quatro grupos de pesquisadores detectaram, independentemente, uma enzima em extratos celulares, que poderia formar um polímero de RNA a partir de ribonucleosídeos 5'-trifosfato. Trabalho subseqüente na RNA polimerase purificada de *E. coli* ajudou a definir as propriedades fundamentais da transcrição (Fig. 26-1). A **RNA polimerase dependente de DNA** requer, além de um molde de DNA, todos os quatro ribonucleosídeos 5'-trifosfato (ATP, GTP, UTP e CTP) como precursores das unidades nucleotídicas do RNA, bem como Mg^{2+}. A química da síntese do RNA tem muito em comum com a síntese do DNA. A RNA polimerase alonga uma fita de RNA adicionando unidades ribonucleotídeas na extremidade hidroxila 3' de uma fita e construindo RNA na direção 5'→3'. O grupo hidroxila 3' age como um nucleofílico, atacando o fosfato α do ribonucleosídeo trifosfato que chega (como ilustrado para a síntese do DNA na Fig. 25-5) e liberando pirofosfato. A reação geral é:

$$\underset{\text{RNA}}{(\text{NMP})_n} + \text{NTP} \xrightarrow{\text{RNA polimerase}} \underset{\text{RNA alongado}}{(\text{NMP})_{n-1}} + \text{PP}_i$$

A RNA polimerase requer DNA para a atividade e é mais ativa quando ligada a uma fita dupla de DNA. Como observado anteriormente, apenas uma das duas fitas do DNA funciona como molde. A fita molde do DNA é copiada na direção 3'→5' (antiparalela à nova fita de RNA), exatamente como na replicação do DNA. Cada nucleotídeo no RNA recém-sintetizado é selecionado pelas interações de pareamento de bases Watson-Crick; resíduos de uridilato (U) são inseridos no RNA para parear com resíduos de adenilato no molde de DNA, e assim por diante. A geometria do pareamento de bases (Fig. 25-6) pode também desempenhar um papel na seleção das bases.

Ao contrário da DNA polimerase, a RNA polimerase não requer um iniciador para começar a síntese. A iniciação ocorre quando a RNA polimerase se liga a seqüências específicas do DNA, chamadas de promotores (descritos a seguir). O grupo 5'-trifosfato do primeiro resíduo em uma molécula de RNA nascente (formada de novo) não é clivado para liberar PP_i, mas, em vez disso, permanece intacto durante toda a transcrição. Durante a fase de alongamento da transcrição, a extremidade crescente da nova fita de RNA faz pareamento de bases temporariamente com o DNA molde para formar um híbrido RNA-DNA de dupla hélice, estimado em oito pares de bases de comprimento (Fig. 26-1a). O RNA nesse dúplex híbrido "se desgruda" logo depois da sua formação, e o DNA dúplex se forma de novo.

Para capacitar a RNA polimerase a sintetizar uma fita de RNA complementar a uma das fitas do DNA, o DNA dúplex deve se desenrolar a uma pequena distância, formando uma "bolha" de transcrição. Durante a transcrição, a RNA polimerase da *E. coli* geralmente mantém cerca de 17 pares de bases desenrolados. Um pequeno híbrido RNA-DNA ocorre na região desenrolada. O alongamento de um transcrito pela RNA polimerase da *E. coli* prossegue a uma velocidade de 50 a 90 nucleotídeos/segundo. Pelo fato de o DNA ser uma hélice, a movimentação de uma bolha de transcrição requer considerável rotação de fita das moléculas do ácido nucléico. A rotação da fita de DNA é restringida na maioria dos DNAs pelas proteínas de ligação ao DNA e outras barreiras estruturais. Em conseqüência, uma RNA polimerase em movimento gera ondas de superespiras positivas na frente da bolha de transcrição e superespiras negativas atrás (Fig. 26-1b). Isso tem sido observado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (em bactérias). Na célula, os problemas topológicos causados pela transcrição são aliviados por meio da ação das topoisomerases.

As duas fitas complementares do DNA possuem papéis diferentes na transcrição. A fita que funciona como molde para a síntese do RNA é chamada de **fita molde**. A fita de DNA complementar ao molde, a **fita não-molde** ou **fita codificadora**, é idêntica na sua seqüência de bases ao RNA transcrito do gene, com U no lugar de T (Fig. 26-2). A fita codificadora para um determinado gene pode se localizar em qualquer fita de um dado cromossomo (Fig. 26-3). As seqüências reguladoras que controlam a transcrição (descritas posteriormente neste capítulo) são por convenção designadas como seqüências na fita não-molde.

A RNA polimerase dependente de DNA da *E. coli* é uma enzima grande e complexa, contendo cinco subunidades básicas ($\alpha_2\beta\beta'\varpi$; M_r 390.000) e uma sexta subunidade, uma de um grupo designada como σ. A subunidade σ, cujas variantes são designadas pelo tamanho (peso molecular), liga-se transitoriamente ao núcleo básico e direciona a enzima para sítios de ligação específicos no DNA (descritos a seguir). Essas seis subunidades constituem a RNA polimerase holoenzima (Fig. 26-4). A RNA polimerase holoenzima da *E. coli* existe, portanto, em várias formas, dependendo do tipo de subunidade σ. A subunidade mais comum é a σ^{70} (M_r 70.000), e a próxima discussão focalizará a RNA polimerase holoenzima correspondente.

RNA polimerases não possuem uma atividade exonuclease 3'→5' revisora (como aquela encontrada em muitas DNA polimerases), e cerca de um erro é cometido a cada 10^4 a 10^5 ribonucleotídeos incorporados ao RNA durante a transcrição. Pelo fato de muitas cópias de um RNA serem geralmente produzidas a partir de um único gene e de todos os RNAs serem eventual-

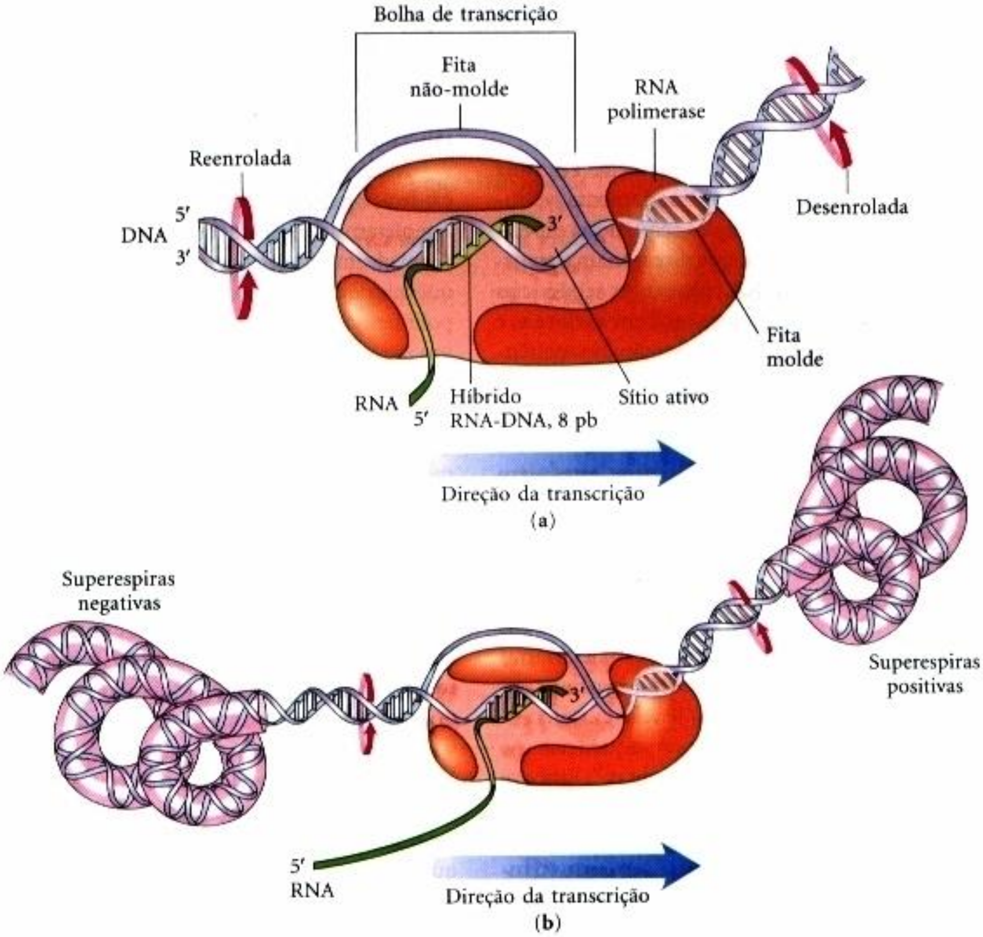


Figura 26-1 – Transcrição pela RNA polimerase na *E. coli*. Para sintetizar uma fita de RNA complementar a uma das duas fitas de DNA em uma dupla hélice, o DNA é transitoriamente desenrolado. (**a**) Cerca de 17 pares de bases são desenrolados em um determinado momento. A bolha de transcrição se move da esquerda para a direita, como mostrado, mantendo passo com a síntese do RNA. O DNA é desenrolado na frente e reenrolado atrás, à medida que o RNA é transcrito. As setas vermelhas indicam a direção na qual o DNA e o híbrido curto RNA-DNA devem rodar para permitir esse processo. À medida que o DNA é desenrolado o híbrido RNA-DNA é deslocado e a fita de RNA é expelida. A RNA polimerase está em íntimo contato com o DNA à frente da bolha de transcrição, bem como com as fitas de DNA separadas e o RNA dentro e imediatamente atrás da bolha. A pegada da polimerase abarca cerca de 35 pares de bases do DNA durante o alongamento. (**b**) Superespiralamento do DNA provocado pela transcrição. Superespiras positivas formam-se na frente da bolha de transcrição e superespiras negativas formam-se atrás.

Figura 26-2 – Fitas molde e não-molde (codificadora) do DNA. As duas fitas complementares do DNA são definidas pela sua função na transcrição. O transcrito de RNA é sintetizado na fita molde complementar e é idêntico em seqüência (com U no lugar de T) à fita não-molde ou codificadora.

(5′) CGCTATAGCGTTT (3′)	Fita DNA não-molde (codificadora)
(3′) GCGATATCGCAAA (5′)	Fita DNA molde
(5′) CGCUAUAGCGUUU (3′)	Transcrito de RNA

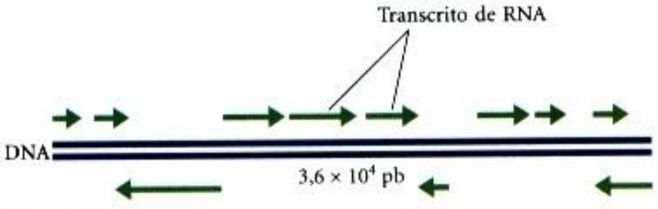


Figura 26-3 – A informação genética do genoma do adenovírus (um exemplo simples conveniente) é codificado por uma molécula de DNA de fita dupla de 36.000 pares de bases, sendo que ambas as fitas codificam proteínas. A informação, para a maioria das proteínas, é codificada pela fita superior (por convenção, a fita é transcrita da esquerda para a direita), mas, algumas proteínas são codificadas pela fita inferior, que é transcrita na direção oposta. A síntese do mRNA no adenovírus é, na verdade, muito mais complexa do que o mostrado aqui. Muitos dos mRNA mostrados para a fita superior são inicialmente sintetizados como um longo transcrito (25.000 nucleotídeos), que é então processado extensivamente para produzir os mRNA separados. O adenovírus causa infecções do trato respiratório superior em alguns vertebrados.

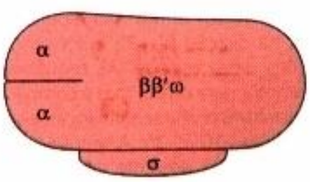


Figura 26-4 – A estrutura da RNA polimerase da *E. coli* e suas funções na transcrição. A polimerase possui seis subunidades. As subunidades α (duas cópias), β, β′ e ϖ possuem pesos moleculares de 36.500, 151.000, 155.000 e 11.000, respectivamente. A subunidade ϖ não é requerida para a atividade *in vitro*, e sua função não é conhecida. A subunidade σ funciona apenas no reconhecimento do promotor e não está presente durante a fase de alongamento da transcrição. Os vários tipos de subunidades σ reconhecem seqüências reguladoras diferentes. O principal tipo é o σ^{70}, refletindo seu M_r de 70.000. Acredita-se que o sítio ativo para a síntese do RNA seja formado pelas subunidades β e β′.

mente degradados e substituídos, um erro em uma molécula de RNA é de menor conseqüência para a célula do que um erro na informação permanente armazenada no DNA.

A síntese de RNA é iniciada nos promotores

A iniciação da síntese do RNA em pontos aleatórios em uma molécula de DNA seria um processo extraordinariamente perdulário. Na verdade, a RNA polimerase se liga a seqüências específicas do DNA chamadas de **promotores**, que direcionam a transcrição de segmentos adjacentes do DNA (genes). As seqüências nas quais a RNA polimerase se liga podem ser bem variáveis, e muito se tem pesquisado a respeito da identificação das seqüências específicas que são críticas para a função promotora.

Na *E. coli*, a ligação da RNA polimerase ocorre dentro de uma região que se estende desde cerca de 70 pares de bases antes do sítio de início da transcrição até cerca de 30 pares de bases além dele. Por convenção, aos pares de base de DNA que correspondem ao início de uma molécula de RNA são dados números positivos e àqueles que precedem o sítio do início do RNA são dados números negativos. A região promotora, dessa forma, estende-se entre as posições −70 e +30. Análise e comparações das seqüências na classe mais comum de promotores bacterianos (aqueles reconhecidos por uma RNA polimerase holoenzima contendo σ^{70}) revelaram semelhanças em duas seqüências curtas, centradas nas posições −10 e −35 (Fig. 26-5). Essas seqüências são sítios de interações importantes para a subunidade σ^{70}. Embora as seqüências não sejam idênticas para todos os promotores bacterianos dessa classe, certos nucleotídeos que são particularmente comuns em cada posição formam uma **seqüência consenso** (lembre-se da seqüência consenso da *ori*C na *E. coli*; veja Fig. 25-11). A seqüência consenso para a região −10 é (5')TATAAT(3'); a seqüência consenso na região −35 é (5')TTGACA(3'). Um terceiro elemento de reconhecimento rico em AT, chamado de elemento UP ("*up*stream promoter", ou promotor a montante), ocorre em promotores de certos genes altamente expressos, entre as posições −40 e −60. O elemento UP é ligado pela subunidade α da RNA polimerase. A eficiência com que uma RNA polimerase se liga a um promotor e inicia a transcrição é determinada, em grande parte, por essas seqüências, pelo espaçamento entre elas e sua distância do sítio de início da transcrição.

Muitas linhas independentes de evidência atestam a importância funcional dessas seqüências nas regiões −35 e −10. Mutações que afetam a função de um determinado promotor freqüentemente envolvem um dos pares de bases nessas regiões. Variações na seqüência de consenso também afetam a eficiência da ligação da RNA polimerase e da iniciação da transcrição. Uma mudança em apenas um par de base pode diminuir a velocidade de iniciação de várias ordens de grandeza. A seqüência do promotor, dessa forma, estabelece um nível basal de expressão para genes específicos da *E. coli*, que pode variar consideravelmente de um gene para o outro. Um método que fornece informação sobre a interação entre a RNA polimerase e os promotores está ilustrado no Adendo 26-1.

A via de iniciação da transcrição está se tornando, cada vez mais, bem definida (Fig. 26-6). Ela consiste de duas partes principais, cada uma com múltiplas etapas. Primeiro, a polimerase se liga ao promotor, formando, em sucessão, um complexo fechado (no qual o DNA ligado está intacto) e um complexo aberto (no qual o DNA ligado está intacto e parcialmente desenrolado). Segundo, a transcrição é iniciada dentro do complexo, levando a uma alteração de conformação, que converte o complexo à sua forma de alongamento, seguida pela movimentação do complexo de iniciação para fora do promotor (liberação do promotor). Qualquer uma dessas etapas pode ser afetada pela seqüência específica do promotor.

A *E. coli* possui outras classes de promotores que são ligados por RNA polimerases holoenzimas com diferentes fatores σ. Um exemplo é o dos promotores dos genes do choque térmico. Os produtos desse conjunto de genes são sintetizados em altos níveis quando a célula recebe um estresse, como um aumento súbito na temperatura. A RNA polimerase liga-se aos

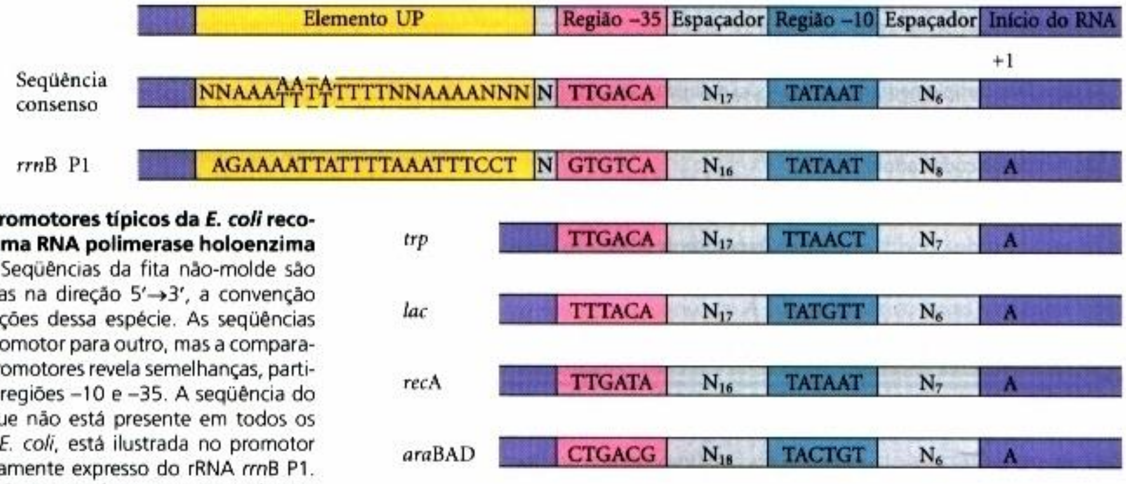


Figura 26-5 – Promotores típicos da *E. coli* reconhecidos por uma RNA polimerase holoenzima contendo σ^{70}. Seqüências da fita não-molde são mostradas e lidas na direção 5'→3', a convenção para representações dessa espécie. As seqüências variam de um promotor para outro, mas a comparação de muitos promotores revela semelhanças, particularmente nas regiões −10 e −35. A seqüência do elemento UP, que não está presente em todos os promotores da *E. coli*, está ilustrada no promotor para o gene altamente expresso do rRNA *rrn*B P1. Os elementos UP são geralmente encontrados na região entre −40 e −60 e estimulam intensamente a transcrição nos promotores que a continham. O elemento UP no promotor *rrn*B P1 abrange a região entre −38 e −59. A seqüência consenso para os promotores da *E. coli* reconhecidos por σ^{70} é mostrada na segunda fila a partir do topo. As regiões espaçadoras contêm número ligeiramente variável de nucleotídeos (N). Apenas o primeiro nucleotídeo que codifica o transcrito de RNA (na posição +1) é mostrado.

Adendo 26-1 A RNA polimerase deixa a sua pegada em um promotor

A **pegada** ("footprinting"), uma técnica derivada de princípios usados no seqüenciamento de DNA, identifica as seqüências de DNA que estão ligadas a uma proteína em particular. Um fragmento de DNA, que contenha seqüências reconhecidas pela proteína de ligação ao DNA, é isolado e marcado radioativamente na extremidade de uma fita (Fig. 1). Reagentes químicos ou enzimáticos são usados para introduzir quebras aleatórias no fragmento de DNA (em média uma por molécula). A separação dos produtos radioativos de clivagem (fragmentos quebrados de vários tamanhos), por eletroforese de alta resolução, revela uma "escada" de bandas radioativas. Em um tubo separado, o procedimento de clivagem é repetido em cópias do mesmo fragmento de DNA, ao qual se liga a proteína, prevenindo a clivagem do DNA na região à qual está ligada. Os dois conjuntos de produtos de clivagem são então submetidos à eletroforese e comparados lado a lado. Um vazio (ou pegada) ocorre na série das bandas radioativas derivadas da amostra contendo a proteína ligada, por causa da proteção ao DNA pela proteína. Isso identifica as seqüências que estão ligadas à proteína.

A localização precisa desse sítio de ligação pode ser determinada diretamente pelo seqüenciamento (veja Fig. 10-37) do fragmento de DNA original e incluindo as canaletas de seqüenciamento (não mostradas aqui) no mesmo gel com a pegada. A pegada resultante da ligação da RNA polimerase a um fragmento de DNA que contém um promotor é mostrada na Figura 2. A polimerase cobre cerca de 60-80 pares de bases; a proteção pela enzima ligada inclui as regiões –10 e –35.

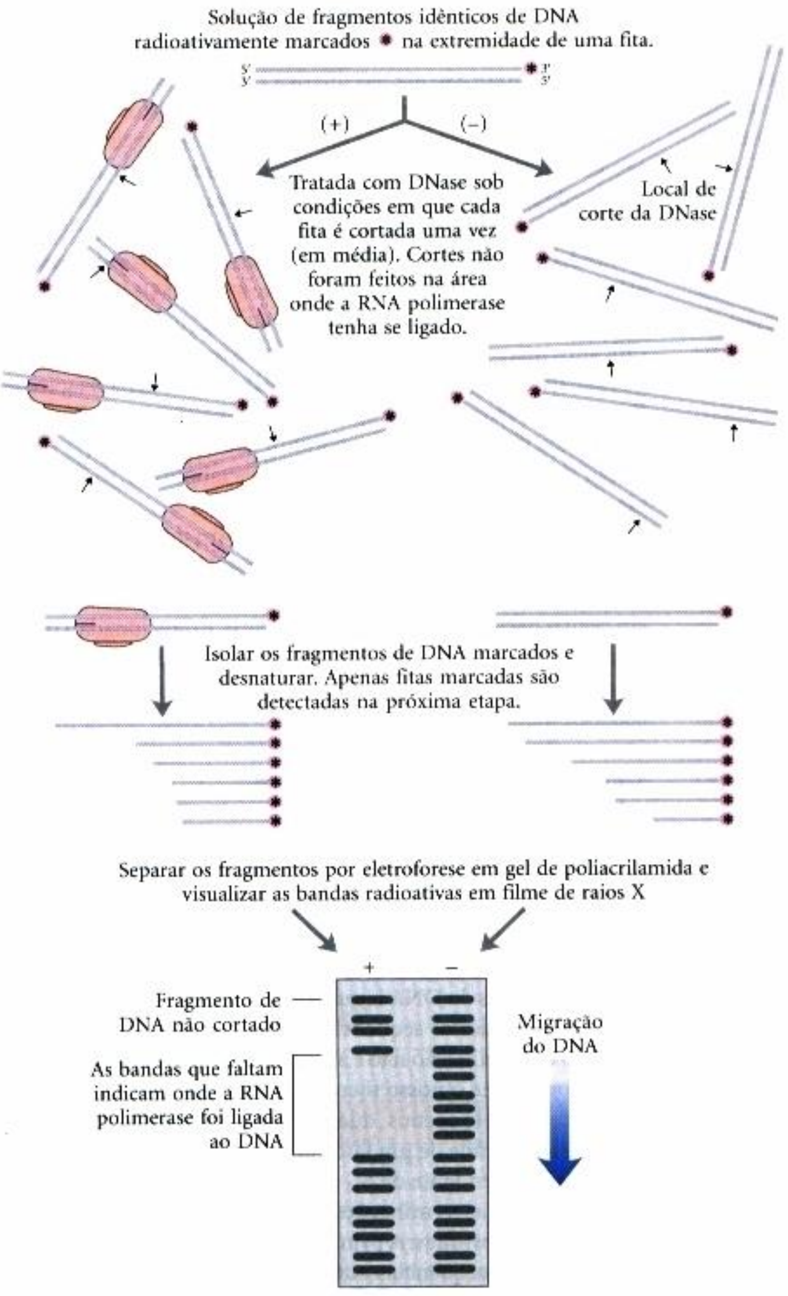

Solução de fragmentos idênticos de DNA radioativamente marcados ✱ na extremidade de uma fita.
5'
3'
3'
5'
(+)
(–)
Tratada com DNase sob condições em que cada fita é cortada uma vez (em média). Cortes não foram feitos na área onde a RNA polimerase tenha se ligado.
Local de corte da DNase
Isolar os fragmentos de DNA marcados e desnaturar. Apenas fitas marcadas são detectadas na próxima etapa.
Separar os fragmentos por eletroforese em gel de poliacrilamida e visualizar as bandas radioativas em filme de raios X
+
–
Fragmento de DNA não cortado
As bandas que faltam indicam onde a RNA polimerase foi ligada ao DNA
Migração do DNA

Figura 1 – Análise da pegada do sítio de ligação da RNA polimerase a um fragmento de DNA. Experimentos separados são realizados na presença (+) ou ausência (–) da RNA polimerase.

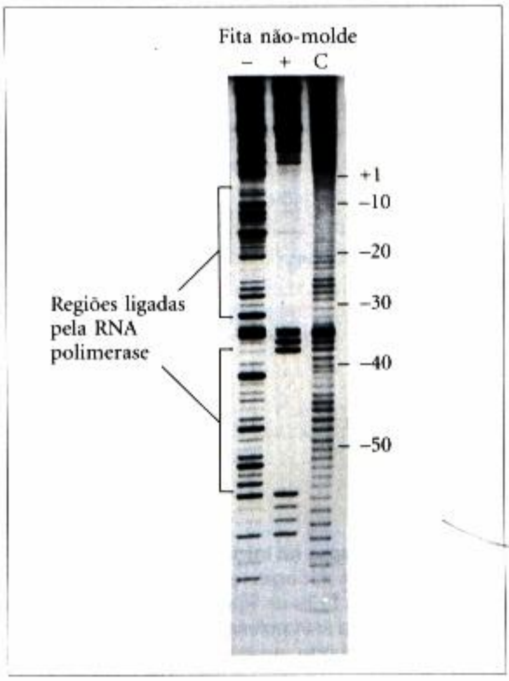

Fita não-molde
–
+
C
+1
–10
–20
–30
–40
–50
Regiões ligadas pela RNA polimerase

Figura 2 – Pegada resultante da ligação da RNA polimerase ao promotor *lac* (veja Fig. 26-5). Nesse experimento, a extremidade 5' da fita não-molde foi marcada radioativamente. A canaleta C é um controle no qual os fragmentos de DNA são clivados com um reagente químico que produz um padrão de bandeamento mais uniforme.

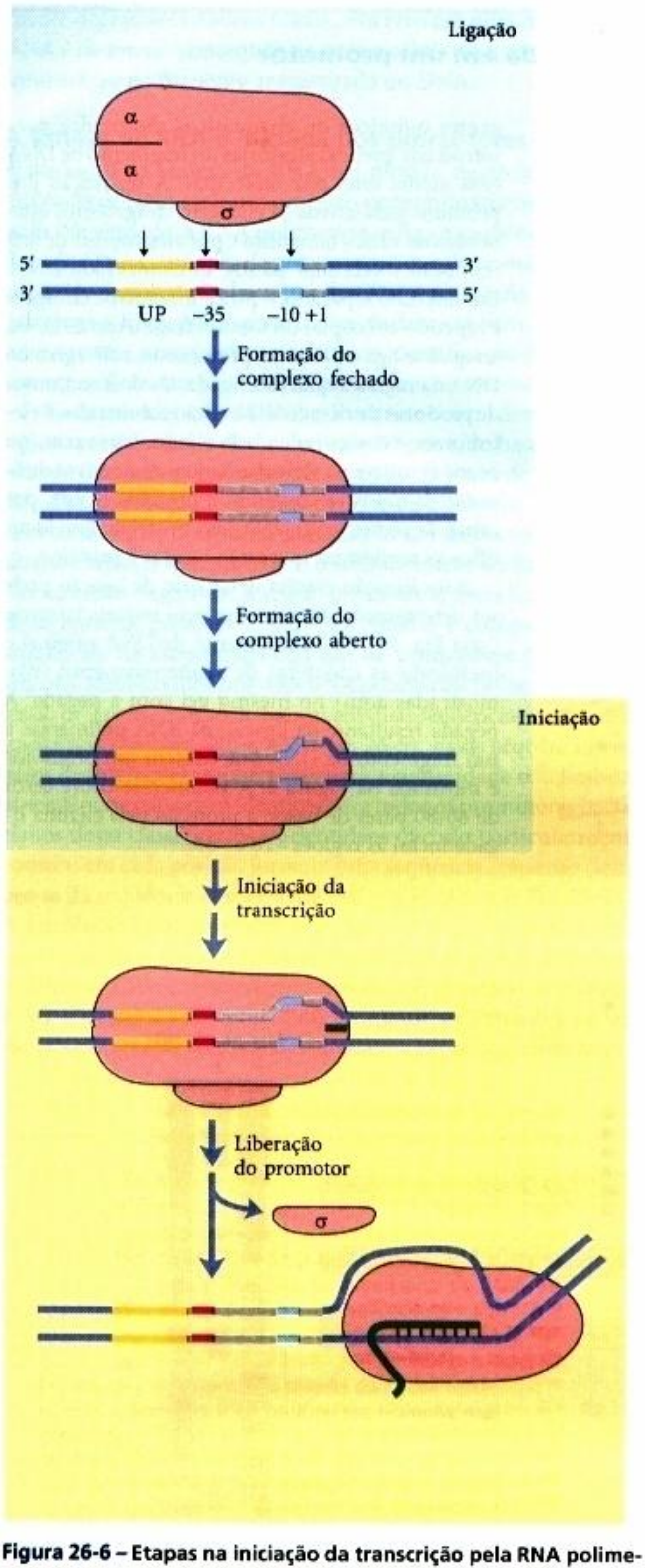


Figura 26-6 – Etapas na iniciação da transcrição pela RNA polimerase da *E. coli*. A iniciação requer várias etapas, geralmente divididas em duas fases: as fases de ligação e de iniciação. Na fase de ligação, a interação inicial da RNA polimerase com o promotor leva à formação de um complexo fechado, no qual o DNA promotor está ligado estavelmente, mas não está desenrolado. Uma região de 12 a 15 pares de bases do DNA — dentro da região −10 até a posição +2 ou +3 — é então desenrolada para formar um complexo aberto. Intermediários adicionais (não mostrados) foram detectados nas vias que levam aos complexos fechado e aberto, junto com várias alterações na conformação de proteínas. A fase de iniciação envolve a iniciação da transcrição e a liberação do promotor. Logo que os primeiros oito ou nove nucleotídeos de um RNA novo são sintetizados, a subunidade σ é liberada e a polimerase deixa o promotor e se torna comprometida na produção do alongamento do RNA.

promotores desses genes quando o σ^{70} for substituído pela subunidade σ^{32} (M_r 32.000), que é específica para os promotores do choque térmico (veja Fig. 28-3). Usando diferentes fatores σ, a célula pode coordenar a expressão de conjuntos de genes que permitem grandes mudanças na fisiologia celular.

A transcrição é regulada

Os requerimentos para qualquer produto gênico variam de acordo com as condições celulares ou a etapa do desenvolvimento, e a transcrição de cada gene é cuidadosamente regulada para formar produtos gênicos apenas na proporção necessária. A regulação pode ocorrer em qualquer etapa da transcrição, incluindo o alongamento e a terminação. Entretanto, grande parte da regulação é direcionada às etapas de ligação da polimerase e de iniciação da transcrição, esquematizadas na Figura 26-6. Diferenças nas seqüências do promotor são apenas um dos vários níveis de controle.

A ligação de proteínas a seqüências tanto próximas quanto distantes do promotor pode também afetar os níveis de expressão gênica. A ligação de proteínas pode tanto *ativar* a transcrição, facilitando a ligação da RNA polimerase ou etapas posteriores no processo de iniciação, quanto *reprimir* a transcrição, bloqueando a atividade da polimerase. Na *E. coli*, uma proteína que ativa a transcrição é a **proteína receptora do cAMP** (**CRP** "*c*AMP *r*eceptor *p*rotein"), que aumenta a transcrição de genes que codificam enzimas que metabolizam outros açúcares que não a glicose, quando as células são cultivadas na ausência da glicose. **Repressores** são proteínas que bloqueiam a síntese do RNA em genes específicos. No caso do repressor Lac (Capítulo 28), a transcrição dos genes para as enzimas do metabolismo da lactose é bloqueada quando esta não está disponível.

A transcrição é a primeira etapa na complicada e dependente intensamente de energia, via da síntese das proteínas, de forma que grande parte da regulação dos níveis de proteínas, tanto em células bacterianas quanto eucarióticas, é direcionada à transcrição, particularmente nas suas etapas iniciais. No Capítulo 28, descreveremos muitos mecanismos pelos quais essa regulação é conseguida.

Seqüências específicas sinalizam a terminação da síntese de RNA

A síntese do RNA é processiva (ou seja, a RNA polimerase possui alta processividade, veja pág. 738) — e isso necessariamente porque, se uma RNA polimerase liberar um transcrito de RNA prematuramente, ela não consegue retomar a síntese do mesmo RNA, devendo começar de novo. Entretanto, um encontro com certas seqüências do DNA levam a uma pausa na síntese do RNA, e, em algumas dessas seqüências, a transcrição é terminada. O processo de terminação não é ainda bem entendido nos eucariotos, de forma que o nosso foco está novamente nas bactérias. A *E. coli* possui, pelo menos, duas classes de sinais de terminação: uma classe depende de um fator protéico chamado de ρ (*rho*), e o outro é independente de ρ.

A maioria das terminações independentes de ρ possui duas características distintas. A primeira é uma região cujo transcrito de RNA possui seqüências autocomplementares, permitindo a formação de uma estrutura grampo (veja Fig. 10-21a) centrada em 15 a 20 nucleotídeos antes da extremidade da fita do RNA. A segunda característica é um colar curto de adenilatos na fita molde, que é transcrito em uridilatos na extremidade 3′ do RNA. Quando a polimerase chega a um sítio de terminação com essa estrutura, ela faz uma pausa (Fig. 26-7). A formação da estrutura grampo no RNA pode romper interações importantes entre o RNA e a RNA polimerase, facilitando a dissociação do transcrito.

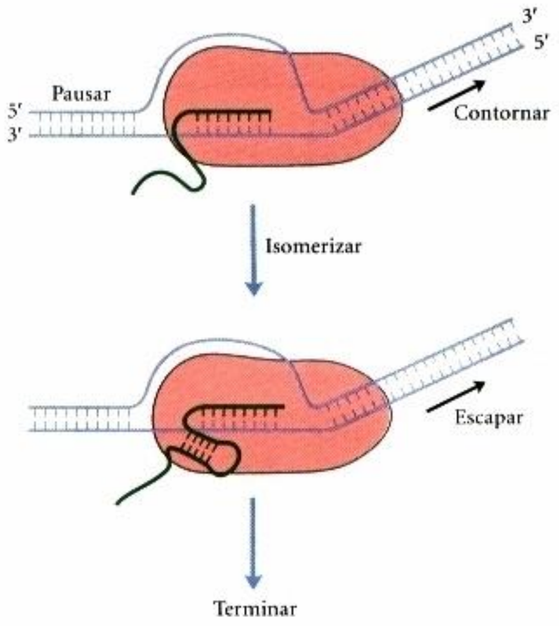


Figura 26-7 – Um modelo para a terminação da transcrição independente de ρ em *E. coli*. A RNA polimerase faz uma pausa em uma variedade de seqüências do DNA, algumas das quais são terminadores. Um de dois resultados é, então, possível: ou a polimerase contorna o sítio e continua no seu caminho, ou o complexo sofre uma alteração conformacional (isomerização). No último caso, o pareamento intramolecular de seqüências complementares no transcrito de RNA recentemente formado pode formar um grampo que rompe o híbrido RNA-DNA e/ou as interações entre o RNA e a polimerase, resultando na isomerização. Uma região híbrida A-U, na extremidade 3' do novo transcrito, é relativamente instável, e o RNA se dissocia completamente, levando à terminação e à dissociação da molécula de RNA. Esse é o resultado usual nos terminadores. Em outros sítios de pausa, o complexo pode escapar depois da etapa de isomerização para continuar a síntese do RNA.

As terminações dependentes de ρ não possuem a seqüência de adenilatos repetidos na fita molde, mas, às vezes, possuem um seqüência curta que é transcrita para formar um grampo. A proteína ρ se liga no RNA em sítios de ligação específicos e migra na direção 5'→3', até alcançar o complexo de transcrição que está pausado em um sítio de terminação. Aí ela contribui para liberar o transcrito do RNA. A proteína ρ possui uma atividade helicase DNA-RNA dependente de ATP que promove a translocação de uma proteína ao longo do RNA, e o ATP é hidrolisado pela proteína ρ durante o processo de terminação. O mecanismo detalhado, pelo qual a proteína age, não é conhecido.

As células eucarióticas possuem três espécies de RNA polimerases nucleares

A maquinaria transcricional no núcleo de uma célula eucariótica é muito mais complexa do que na bactéria. Os eucariotos possuem três RNA polimerases, designadas I, II e III, que são complexos distintos mas possuem certas subunidades em comum. Cada polimerase tem uma função específica e liga-se a diferentes seqüências de promotores.

A RNA polimerase I (Pol I) é responsável pela síntese de apenas um tipo de RNA, um transcrito de RNA pré-ribossomal, que contém o precursor dos rRNAs 18S, 5,8S e 28S (veja Fig. 26-24). Os promotores da Pol I variam muito quanto à seqüência de uma espécie para outra.

A principal função da RNA polimerase II (Pol II) é a síntese dos mRNAs e alguns RNAs especializados. Essa enzima deve reconhecer milhares de promotores, que podem variar muito quanto à seqüência. Muitos promotores Pol II possuem algumas características de seqüência em comum, incluindo uma seqüência TATA (seqüência consenso TATAA), próxima ao par de base –30, e uma seqüência Inr (iniciadora), próxima ao sítio de início em +1 (Fig. 26-8).

A RNA polimerase III (Pol III) sintetiza tRNAs, o rRNA 5S e alguns outros RNAs pequenos especializados. Os promotores reconhecidos pela RNA polimerase III são bem caracterizados. Curiosamente, algumas das seqüências requeridas para a regulação da iniciação da transcrição pela RNA polimerase III estão localizadas dentro do próprio gene, enquanto outras são encontradas em localizações mais convencionais, a montante do sítio de início do RNA (Capítulo 28).

A RNA polimerase II requer muitos outros fatores protéicos para sua atividade

A RNA polimerase II é central para a expressão dos genes eucarióticos e tem sido estudada extensivamente. Ela é admiravelmente mais complexa do que sua contrapartida bacteriana, embora a subunidade maior exiba um alto grau de homologia com a subunidade β' da RNA polimerase bacteriana. A polimerase é uma imensa enzima com 12 subunidades. Ela requer um dispositivo de outras proteínas, chamadas de **fatores de transcrição**, ordenadas para formar o complexo de transcrição ativo. Os **fatores basais de transcrição** requeridos em cada promotor da RNA polimerase II (fatores usualmente designados como TFII, com um identificador adicional) são altamente conservados em todos os eucariotos (Tabela 26-1). O processo de transcrição pela RNA polimerase II pode ser descrito em termos de várias fases — montagem, iniciação, alongamento e terminação —, cada uma asso-

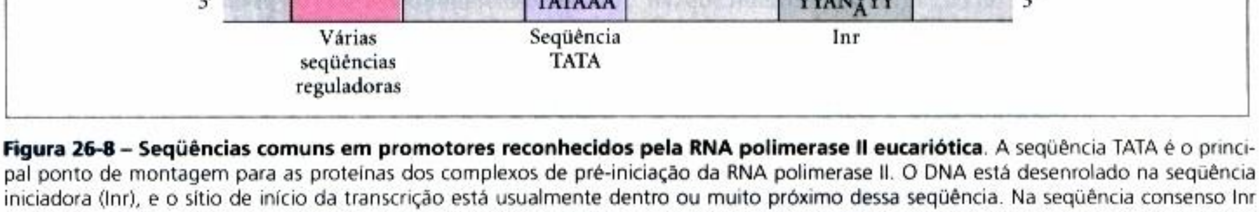

–30
+1
5'
TATAAA
YYAN$\overset{T}{\underset{A}{}}$YY
3'
Várias seqüências reguladoras
Seqüência TATA
Inr

Figura 26-8 – Seqüências comuns em promotores reconhecidos pela RNA polimerase II eucariótica. A seqüência TATA é o principal ponto de montagem para as proteínas dos complexos de pré-iniciação da RNA polimerase II. O DNA está desenrolado na seqüência iniciadora (Inr), e o sítio de início da transcrição está usualmente dentro ou muito próximo dessa seqüência. Na seqüência consenso Inr mostrada, N representa qualquer nucleotídeo; Y, um nucleotídeo pirimídico. Muitas seqüências adicionais funcionam como sítios de ligação para uma grande variedade de proteínas que afetam a atividade da RNA polimerase II. Essas seqüências são importantes na regulação dos promotores da RNA polimerase II e variam muito em tipo e número, mas em geral elas tornam o promotor eucariótico muito mais complexo do que o mostrado. Muitas estão localizadas dentro de algumas centenas de pares de bases da seqüência TATA no seu lado 5'; outras podem estar milhares de pares de bases distantes. Os elementos de seqüência, resumidos aqui, são mais variáveis entre os promotores da RNA polimerase II dos eucariotos do que entre os promotores da *E. coli* (Fig. 26-5). Muitos promotores da RNA polimerase II não possuem uma seqüência TATA ou um elemento de consenso Inr, ou ambos. Seqüências adicionais ao redor de TATA e a jusante de Inr (à direita, como descrito) podem ser reconhecidas por um ou mais fatores de transcrição.

Tabela 26-1 – Proteínas requeridas para a transcrição nos promotores da RNA polimerase II eucariótica

Fator de transcrição	Número de subunidades	M_r da subunidade	Funções
Iniciação			
RNA polimerase II	12	10.000-220.000	Catalisa a síntese do RNA
TBP (proteína de ligação a TATA)	1	38.000	Reconhece especificamente a seqüência TATA
TFIIA	3	12.000, 19.000, 35.000	Estabiliza a ligação do TFIIB e TBP ao promotor
TFIIB	1	35.000	Liga-se ao TBP; recruta o complexo TFIIF da RNA polimerase
TFIID	12	15.000-250.000	Interage com proteínas reguladoras positivas e negativas
TFIIE	2	34.000, 57.000	Recruta TFIIH; atividades de ATPase e helicase
TFIIF	2	30.000, 74.000	Liga-se fortemente à RNA polimerase II; liga-se ao TFIIB e previne a ligação da RNA polimerase a seqüências de DNA não específicas
TFIIH	12	35.000-89.000	Desenrola o promotor do DNA; fosforila a RNA polimerase; recruta o complexo de excisão de nucleotídeos
Alongamento[*]			
ELL[†]	1	80.000	
P-TEFb	2	43.000, 124.000	
SII (TFIIS)	1	38.000	
Elongin (SIII)	3	15.000, 18.000, 110.000	

[*] Todos os fatores de alongamento suprimem a pausa ou parada da transcrição pelo complexo TFIIF-RNA polimerase.

[†] O nome é derivado do termo "eleven-nineteen *l*ysine-rich *l*eukemia". O gene para o fator ELL é o sítio dos eventos de recombinação cromossomais, freqüentemente associado à condição cancerosa conhecida como leucemia mielóide aguda.

ciada a proteínas características (Fig. 26-9). A via de montagem, passo a passo descrita a seguir, leva à transcrição ativa *in vitro*. Na célula, muitas das proteínas podem estar presentes em complexos maiores pré-montados, simplificando as vias de montagem nos promotores. A Figura 26-9 e a Tabela 26-1 podem ajudá-lo a manter-se a par dos participantes desse processo.

Montagem da RNA polimerase e fatores de transcrição em um promotor. A formação de um complexo fechado começa quando a proteína de ligação da TATA (TBP — "*TATA-b*inding *p*rotein") se liga à seqüência TATA (Fig. 26-9b). A TBP é ligada, em seguida, pelo fator de transcrição TFIIB, que também se liga ao DNA, de cada lado da TBP. A ligação do TFIIA, embora nem sempre essencial, pode estabilizar o complexo FTIIB-TBP no DNA e se tornar importante em promotores não consensuais, nos quais a ligação da TBP é relativamente fraca. O complexo TFIIB-TBP é em seguida ligado por um outro complexo, que consiste de TFIIF e RNA polimerase II. O TFIIF ajuda a levar a RNA polimerase a seus promotores, tanto por interagir com o TFIIB quanto por reduzir a ligação da RNA polimerase a sítios não específicos no DNA. Finalmente, o TFIIE e o TFIIH se ligam para criar o complexo fechado. O TFIIH possui uma atividade de DNA helicase que promove o desenrolamento do DNA próximo ao sítio de início do RNA (um processo que requer a hidrólise do ATP), criando, por meio disso, um complexo aberto. Contando todas as subunidades dos vários fatores essenciais (excluindo o TFIIA), essa montagem ativa mínima requer mais de 30 polipeptídeos.

A iniciação da fita de RNA e a liberação do promotor. O TFIIH possui uma função adicional durante a fase de iniciação. Uma atividade quinase, em uma das suas subunidades, fosforila a RNA polimerase II em vários lugares no domínio carboxiterminal da maior subunidade da polimerase (Fig. 26-9). Isso causa uma mudança conformacional em todo o complexo, iniciando a transcrição. A fosforilação do domínio carboxiterminal pode ser importante durante a fase subseqüente de alongamento, e isso afeta as interações entre o complexo de transcrição e outras enzimas envolvidas no processamento do transcrito (como descrito a seguir).

Durante a síntese dos 60 a 70 nucleotídeos iniciais do RNA, são liberados primeiro o TFIIE e depois o TFIIH, e a RNA polimerase II entra na fase de alongamento da transcrição.

Alongamento, terminação e liberação. O TFIIF permanece associado à RNA polimerase II por todo o alongamento. Durante essa etapa, a atividade da polimerase é muito aumentada por proteínas chamadas de fatores de alongamento (Tabela 26-1). Uma vez completado o transcrito de RNA, a transcrição é terminada por mecanismos ainda não conhecidos. A RNA polimerase II é desfosforilada e reciclada, pronta para iniciar um outro transcrito (Fig. 26-9).

Regulação da atividade da RNA polimerase II. A regulação da transcrição nos promotores da RNA polimerase II é bem elaborada. Ela envolve a interação de uma grande variedade de outras proteínas com o complexo de pré-iniciação. Algumas dessas proteínas regulatórias interagem com fatores de transcrição, outras com a própria RNA polimerase. Muitas interagem com TFIID, um complexo de cerca de 12 proteínas, incluindo TBP e certos fatores associados ao TBP, ou TAFs ("*TBP-a*ssociated *fac*tors"). A regulação da transcrição é descrita mais detalhadamente no Capítulo 28.

Diversas funções do TFIIH. Nos eucariotos, o reparo do DNA lesado (veja Tabela 25-5) dentro de genes que estão sendo ativamente transcritos é mais eficiente do que o reparo de outras lesões do DNA, e a fita molde é reparada de modo um tanto quanto mais eficiente do que a fita não-molde. Essas observações fora do comum são explicadas pelas funções alternativas das subunidades TFIIH. Não apenas a TFIIH participa da formação do complexo fechado durante a montagem de um complexo transcricional (como descrito anteriormente), mas algumas das suas subunidades são também componentes essenciais do complexo de reparo de excisão de nucleotídeos (Capítulo 25).

Quando a transcrição da RNA polimerase pára no sítio de uma lesão do DNA, o TFIIH pode interagir com a lesão e recrutar o complexo inteiro de reparo por excisão do nucleotídeo. A perda genética de certas subunidades do TFIIH pode produzir doenças humanas. Alguns exemplos são o xeroderma pigmentoso (veja Adendo 25-1) e a síndrome de Cockayne, que é caracterizada pela parada do crescimento, fotossensibilidade e desordens neurológicas.

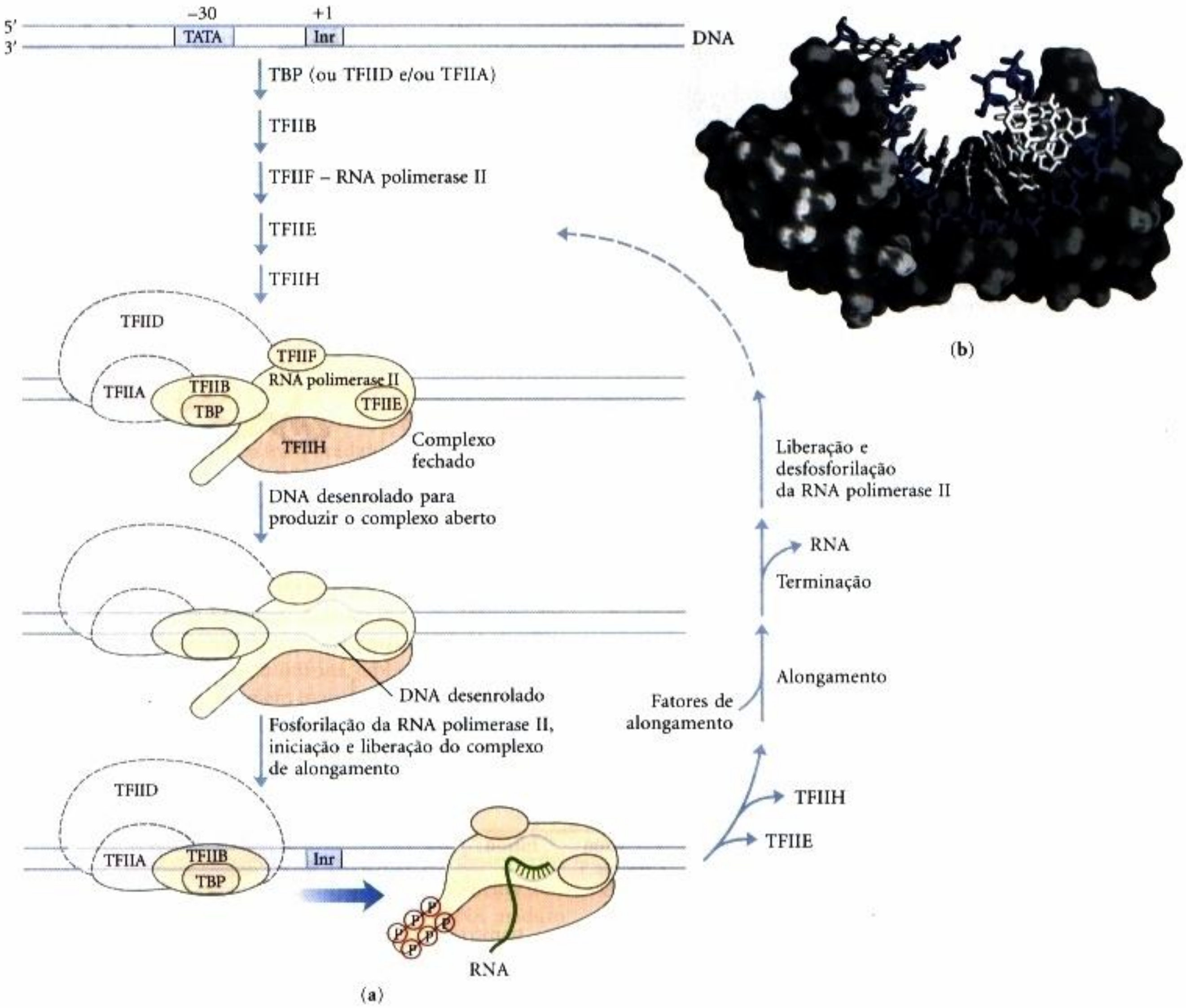

5'
3'
−30
+1
TATA
Inr
DNA
TBP (ou TFIID e/ou TFIIA)
TFIIB
TFIIF – RNA polimerase II
TFIIE
TFIIH
TFIID
TFIIF
TFIIA
TFIIB
RNA polimerase II
TBP
TFIIE
TFIIH
Complexo fechado
DNA desenrolado para produzir o complexo aberto
DNA desenrolado
Fosforilação da RNA polimerase II, iniciação e liberação do complexo de alongamento
TFIID
TFIIA
TFIIB
TBP
Inr
P
RNA
(a)
(b)
Liberação e desfosforilação da RNA polimerase II
RNA
Terminação
Alongamento
Fatores de alongamento
TFIIH
TFIIE

Figura 26-9 – Transcrição nos promotores da RNA polimerase II. (**a**) A montagem seqüencial de um complexo que consiste de TBP (freqüentemente com TFIIA), TFIIB mais a RNA polimerase II, TFIIE, TFIIF e TFIIH leva a um complexo fechado. A TBP freqüentemente se liga como parte de um complexo maior chamado de TFIID. Algumas das subunidades do TFIID desempenham um papel na regulação da transcrição (Capítulo 28). O DNA é desenrolado na região Inr pela atividade helicásica do TFIIH, e talvez do TFIIE, criando um complexo aberto. O domínio carboxiterminal da subunidade maior da RNA polimerase II é fosforilado pelo TFIIH, e a polimerase escapa então do promotor e começa a transcrição. O alongamento é acompanhado pela liberação de muitos fatores de transcrição e é também aumentado pelos fatores de alongamento (veja Tabela 26-1). Depois da terminação, a RNA polimerase é liberada, defosforilada e reciclada. (**b**) A estrutura da TBP (em cinza) ligada ao DNA (em azul e branco).

A RNA polimerase direcionada por DNA pode ser inibida seletivamente

O alongamento das fitas de RNA pela RNA polimerase, tanto em bactérias quanto em eucariotos, é especificamente inibido pelo antibiótico **actinomicina D** (Fig. 26-10). A porção planar dessa molécula insere-se (intercala-se) no DNA dupla hélice, entre pares de bases G≡C sucessivos, deformando o DNA. Isso previne o movimento da polimerase ao longo do molde. Pelo fato de a actinomicina D inibir o alongamento do RNA nas células intactas, bem como em extratos celulares, ela é usada para identificar processos celulares que dependem da síntese de RNA. A **acridina** inibe a síntese de RNA de maneira semelhante (Fig. 26-10).

A **rifampicina** inibe a síntese de RNA bacteriana ao ligar-se à subunidade β da RNA polimerase (veja Fig. 26-4), impedindo a iniciação da transcrição. Ela é, algumas vezes, usada como antibiótico.

O cogumelo *Amanita phalloides* desenvolveu um mecanismo de defesa efetivo contra predadores. Ele produz **α-amanitina**, que interrompe a formação do mRNA nas células animais, bloqueando a RNA polimerase II e, em concentrações mais altas, também a RNA polimerase III. Nem a RNA polimerase I nem a RNA polimerase bacteriana são sensíveis à α-amanitina — nem mesmo a RNA polimerase II do próprio *A. phalloides*.

Processamento do RNA

Muitas das moléculas de RNA na bactéria, e praticamente todas as moléculas de RNA nos eucariotos, são processadas em certo grau depois de ser sintetizadas. Alguns dos eventos moleculares mais interessantes no metabolismo do RNA são encontrados nessas reações pós-sintetizantes. Curiosamente, as enzimas que catalisam essas reações algumas vezes consistem de RNA em vez

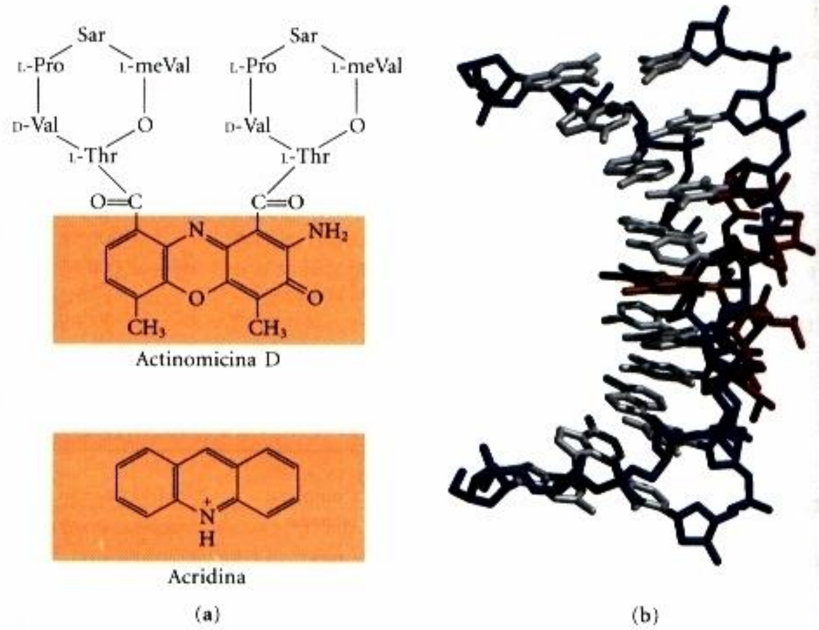


Figura 26-10 – Actinomicina D e acridina, inibidores da transcrição do DNA. (**a**) A porção sombreada da actinomicina D é planar e intercala-se entre dois pares de bases G≡C, sucessivos no DNA dúplex. As estruturas de dois peptídeos cíclicos da actinomicina D se ligam ao sulco menor da dupla hélice. Sarcosina (Sar) é a *N*-metilglicina; meVal é a metilvalina. A acridina também age pela intercalação no DNA. (**b**) Um complexo da actinomicina D com o DNA. O esqueleto carbônico do DNA é mostrado em azul, as bases em branco, a parte intercalada da actinomicina D (sombreada em (**a**)) está em laranja, e o restante da actinomicina está em vermelho. O DNA se curva, em conseqüência da ligação com a actinomicina.

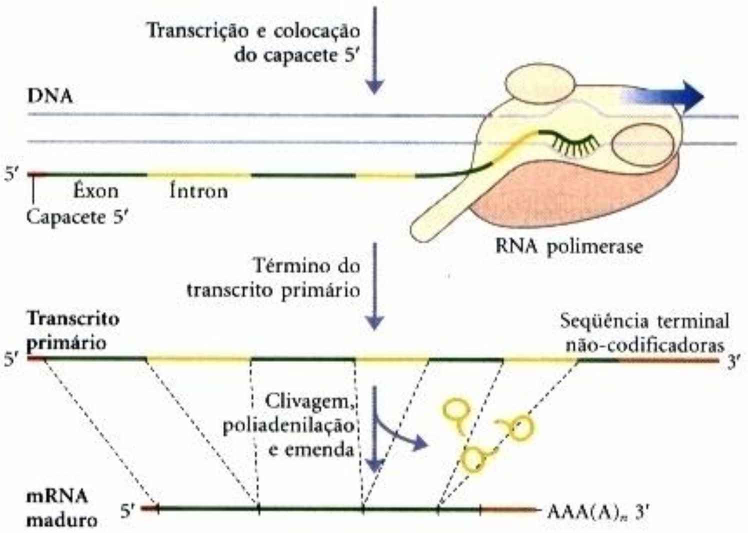

Transcrição e colocação do capacete 5′
DNA
5′
Éxon
Íntron
Capacete 5′
RNA polimerase
Término do transcrito primário
Transcrito primário
5′
Seqüência terminal não-codificadoras
3′
Clivagem, poliadenilação e emenda
mRNA maduro
5′
AAA(A)ₙ 3′

Figura 26-11 – Formação do transcrito primário e seu processamento durante a maturação do mRNA em uma célula eucariótica. O capacete 5′ (em vermelho) é adicionado antes que a síntese do transcrito primário esteja completa. Uma seqüência não-codificadora, que se segue ao último éxon, é mostrada em laranja. A emenda pode ocorrer antes ou depois das etapas de clivagem e poliadenilação. Todos os processos representados aqui estão localizados dentro do núcleo.

de proteína. A descoberta dos RNAs catalíticos, ou **ribozimas**, causou uma revolução na idéia a respeito da função do RNA e sobre a origem da vida.

Uma molécula de RNA recém-sintetizada é chamada de um **transcrito primário.** Talvez os processamentos mais extensos dos transcritos primários ocorram nos mRNAs dos eucariotos e nos tRNAs tanto de bactérias quanto de eucariotos. O transcrito primário de um mRNA eucariótico usualmente contém seqüências cercando um gene, embora as seqüências codificadoras do polipeptídeo possam não ser contíguas. Regiões não-codificadoras que quebram a região codificadora do transcrito são chamadas de íntrons, e os segmentos codificadores são chamados de éxons (veja a discussão a respeito de íntrons e éxons do DNA, no Capítulo 24). Em um processo chamado de **emenda** ("splicing", da mesma forma que em português, o termo inglês se refere apenas ao segundo evento de um processo biológico que inclui o corte e a emenda de fragmentos; quando possível, distinguiremos as duas etapas do processo), os íntrons são removidos dos transcritos primários e os éxons são unidos para formar uma seqüência contígua, especificando um polipeptídeo funcional. Os mRNAs eucarióticos são também modificados em cada extremidade. Uma estrutura chamada de capacete (veja pág. 783) é adicionada à extremidade 5′. A extremidade 3′ é clivada, e 80 a 250 resíduos de adenilato são adicionados para criar uma "cauda" poli(A). Esses processos são esquematizados na Figura 26-11 e descritos mais detalhadamente a seguir.

Os transcritos primários da maioria dos tRNAs procarióticos e eucarióticos são processados pela remoção de seqüências de cada extremidade (chamada de clivagem) e, em alguns casos, pela remoção de íntrons (emenda). Muitas bases e açúcares nos tRNAs são também modificados; tRNAs maduros estão repletos de bases incomuns, não encontradas em outros ácidos nucléicos (veja Fig. 26-26).

O destino final de qualquer RNA é a sua degradação completa. A taxa de renovação dos RNAs desempenha um papel crítico na determinação de seu nível de equilíbrio estacionário e na velocidade pela qual as células podem interromper a expressão de um gene cujo produto não é mais necessário. Durante o desenvolvimento dos organismos multicelulares, por exemplo, é importante que certas proteínas sejam expressas apenas em um estágio, e o mRNA, que codifica tal proteína, deve, portanto, ser feito e destruído nos momentos apropriados.

Os íntrons transcritos no RNA são removidos pela emenda

Nas bactérias, uma cadeia polipeptídica é geralmente codificada por uma seqüência de DNA que é colinear com a seqüência de aminoácidos, continuando ao longo do DNA molde sem interrupção, até que a informação necessária para especificar o polipeptídeo esteja completa. Entretanto, a noção de que todos os genes são contínuos foi inesperadamente contestada em 1977, quando Phillip Sharp e Richard Roberts descobriram, independentemente, que os genes para polipeptídeos nos eucariotos são freqüentemente interrompidos pelas seqüências não-codificadoras (íntrons). A grande maioria dos genes nos vertebrados contém íntrons; entre as poucas exceções, estão os genes que codificam as histonas. A ocorrência de íntrons em outros eucariotos é variável. Muitos genes na levedura *Saccharomyces cerevisiae* não possuem íntrons, embora, em outras espécies de fungos, os íntrons sejam mais comuns. Os íntrons são também encontrados em uns poucos genes bacterianos e arque bacterianos.

Os íntrons no DNA são transcritos junto com o resto do gene pela RNA polimerase. Os íntrons no transcrito primário de RNA são então cortados, e os éxons são emendados para formar um RNA funcional, maduro. Os íntrons foram descobertos quando o DNA de um gene conhecido foi completamente desnaturado e então renaturado, na presença de um RNA maduro derivado daquele gene. O híbrido RNA-DNA que se formou possuía alças de seqüências de DNA que não pareavam com as bases do RNA (Fig. 26-12). Esse e outros métodos mostraram que muitos genes possuem íntrons, alguns dos quais, dezenas deles.

Nos mRNAs eucarióticos, a maioria dos éxons é menor que 1.000 nucleotídeos de comprimento, com muitos no intervalo de tamanho entre 100 e 200 nucleotídeos, codificando trechos de 30 a 60 aminoácidos dentro de um polipeptídeo maior. Os íntrons variam em tamanho, de 50 a 20.000 nucleotídeos. Genes de eucariotos superiores, incluindo o homem, possuem tipicamente muito mais DNA destinado aos íntrons do que aos éxons. Muitos genes possuem íntrons; alguns genes possuem dezenas deles.

O RNA catalisa a emenda

Há quatro classes de íntrons. As duas primeiras, chamadas de íntrons dos grupos I e II, compartilham algumas características-chave, mas diferem nos detalhes de seus mecanismos de emenda. Íntrons do grupo I são encontrados em alguns genes nucleares, mitocondriais e cloroplastiais, que codificam rRNAs, mRNAs e tRNAs. Íntrons do grupo II são geralmente encontrados nos transcritos primários dos mRNAs mitocondriais e cloroplastiais, em fungos, algas e plantas. Íntrons dos grupos I e II são também encontrados entre os raros exemplos de íntrons em bactérias. Nenhuma classe requer um co-fator rico em energia (como o ATP) para a emenda. Os mecanismos de emenda em ambos os grupos envolvem uma reação de transesterificação em duas etapas (Fig. 26-13). Um grupo hidroxila 2′ ou 3′ de uma ribose faz um ataque nucleofílico em um fósforo e, em cada etapa, uma nova ligação fosfodiéster é formada à custa da velha, mantendo o balanço de energia. Essas reações são muito semelhantes às reações de quebra e junção do DNA, promovidas pelas topoisomerases (veja Fig. 24-20) e pelas recombinases sítio-específicas (veja Fig. 25-36).

A reação de corte do grupo I requer um co-fator de guanina, nucleosídeo ou nucleotídeo, mas, o co-fator não é usado como fonte de energia; ao contrário o grupo da hidroxila 3′ da guanosina é usado como um nucleófilo na primeira etapa da via de corte.

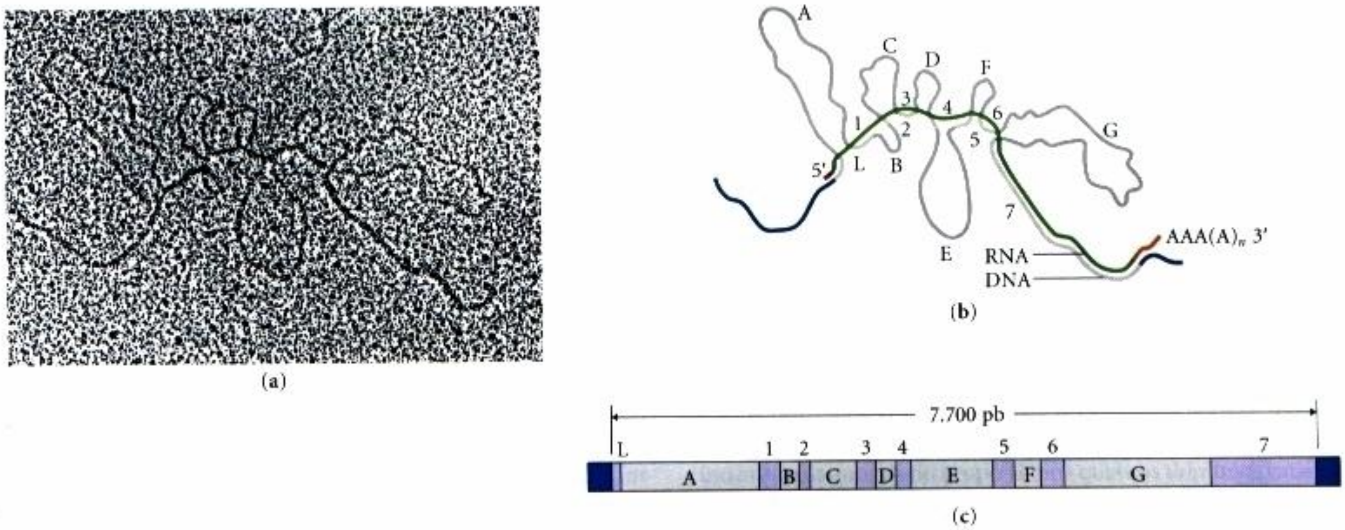


Figura 26-12 – Demonstração das seqüências não-codificadoras no gene da ovoalbumina de galinha pela hibridização RNA-DNA. (**a**) mRNA maduro foi hibridizado com a sua fita complementar no DNA desnaturado que contém o gene da ovoalbumina, e as moléculas resultantes foram visualizadas ao microscópio eletrônico. Algumas regiões do DNA não possuem complemento no mRNA maduro (formado pelo corte do transcrito primário), produzindo as alças de fitas simples de DNA mostradas na eletromicrografia. As alças definem a localização e o tamanho dos íntrons. (**b**) Os íntrons são marcados de A a G e os éxons de 1 a 7; L codifica uma seqüência sinal que endereça a proteína para a exportação da célula (veja Fig. 27-36). A cauda poli(A) define a extremidade 3′ do mRNA. (**c**) Uma representação linear do gene da ovoalbumina, mostrando os íntrons e éxons.

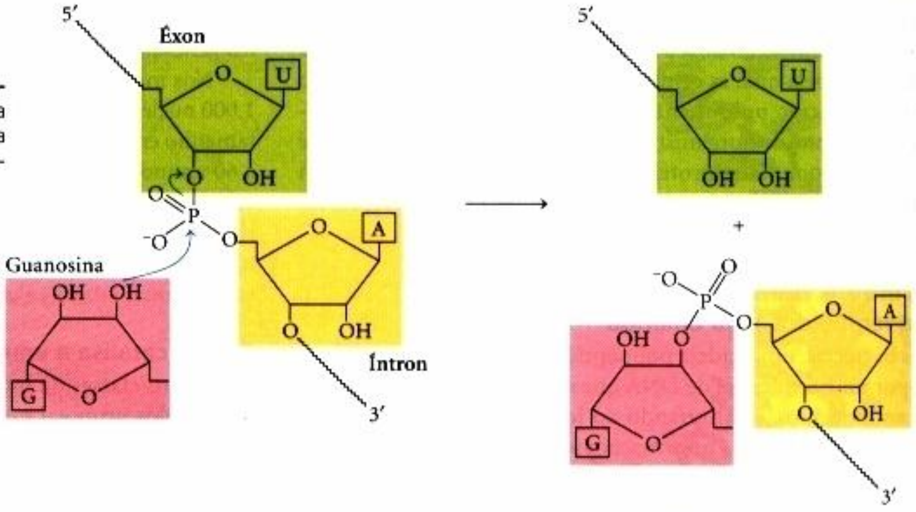
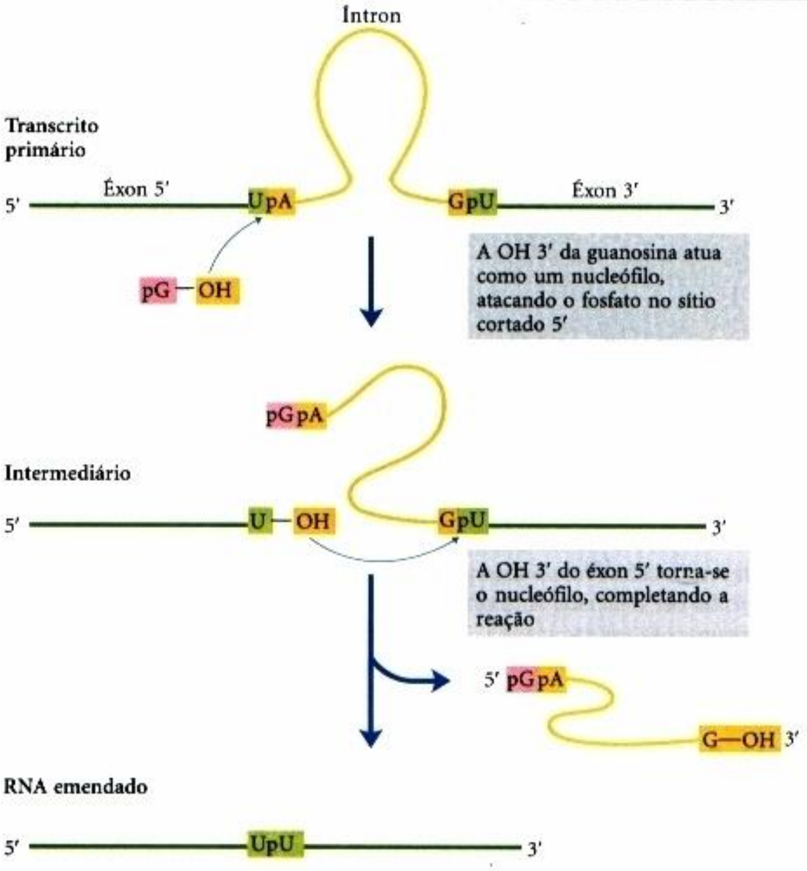


Figura 26-13 – Reação de transesterificação. Essa é a primeira etapa na emenda dos íntrons do grupo I. Aqui, a hidroxila 3′ de uma molécula de guanosina age como um nucleófilo.

O grupo da hidroxila 3′ da guanosina forma uma ligação fosfodiéster normal 3′,5′ com a extremidade 5′ do íntron (Fig. 26-14). A hidroxila 3′ do éxon, que é deslocada nessa etapa, age então como um nucleófilo, em uma reação semelhante na extremidade 3′ do íntron. O resultado é a excisão precisa do íntron e a ligação dos éxons.

Nos íntrons do grupo II, o padrão é semelhante, exceto para o nucleófilo da primeira etapa, que, nesse caso, é o grupo hidroxila 2′ de um resíduo de adenilato *dentro* do íntron (Fig. 26-15). Uma estrutura na forma de laço é formada como um intermediário.

Tentativas para identificar as enzimas que promovem os cortes dos íntrons dos grupos I e II produziram uma grande surpresa: esses íntrons eram *autocortáveis*. Nenhuma enzima protéica estava envolvida. Isso foi primeiro revelado em estudos do mecanismo de corte do íntron do rRNA do grupo I, do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*, por Thomas Cech e colaboradores, em 1982. Esses pesquisadores transcreveram o DNA da *Tetrahymena* isolado (incluindo o íntron) *in vitro*, usando a RNA polimerase bacteriana purificada. O RNA resultante se autocortava precisamente, sem nenhuma enzima



A OH 3′ da guanosina atua como um nucleófilo, atacando o fosfato no sítio cortado 5′

A OH 3′ do éxon 5′ torna-se o nucleófilo, completando a reação

Figura 26-14 – Mecanismo de emenda nos íntrons do grupo I. O nucleófilo, na primeira etapa, pode ser guanosina, GMP, GDP ou GTP. O íntron cortado é eventualmente degradado.

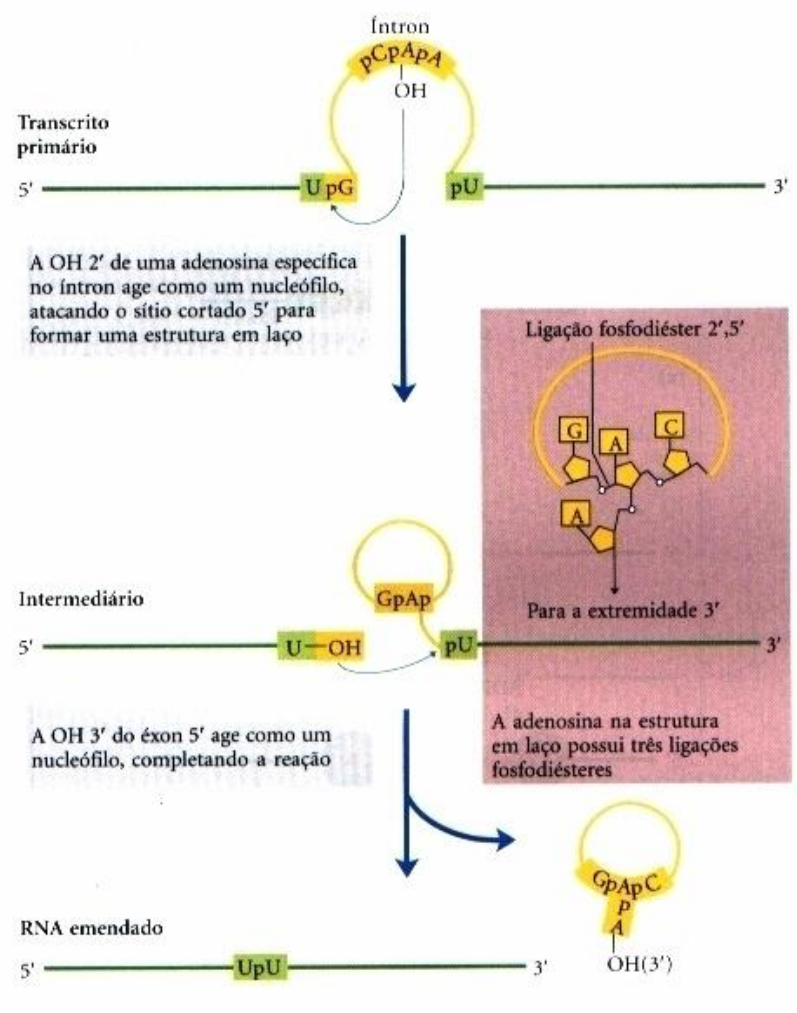
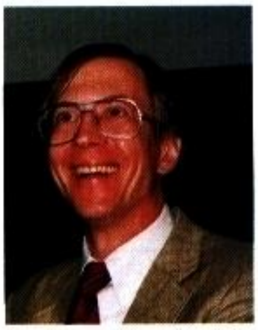

Íntron
pCpApA
OH
Transcrito primário
5'
UpG
pU
3'
A OH 2' de uma adenosina específica no íntron age como um nucleófilo, atacando o sítio cortado 5' para formar uma estrutura em laço
Ligação fosfodiéster 2',5'
G
A
C
A
Para a extremidade 3'
Intermediário
GpAp
5'
U—OH
pU
3'
A adenosina na estrutura em laço possui três ligações fosfodiésteres
A OH 3' do éxon 5' age como um nucleófilo, completando a reação
GpApC
p
A
OH(3')
RNA emendado
5'
UpU
3'

Figura 26-15 – Mecanismo de emenda dos íntrons do grupo II. A química é semelhante àquela da emenda do íntron do grupo I, exceto para a identidade do nucleófilo na primeira etapa e a formação do intermediário em forma de laço, em que uma ramificação é uma ligação fosfodiéster 2',5'.



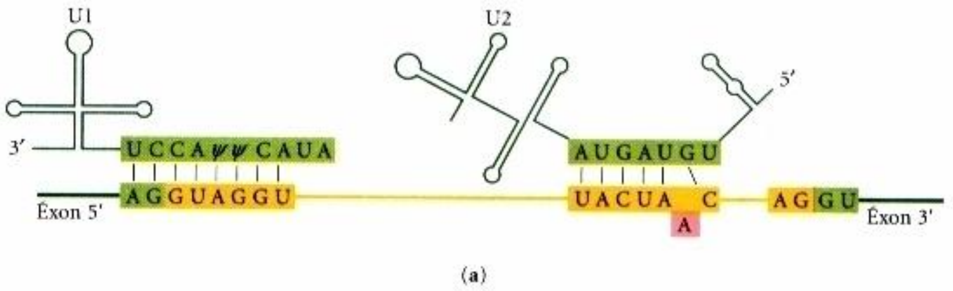
Thomas Cech

protéica da *Tetrahymena*. A descoberta de que RNAs poderiam ter funções catalíticas foi um marco na compreensão dos sistemas biológicos.

Classes de íntrons que não são autocortáveis não são designadas por um grupo numérico. A terceira e maior classe dos íntrons é aquela encontrada nos transcritos primários dos mRNA nucleares. Eles sofrem emenda pelo mesmo mecanismo de formação do laço, como os íntrons do grupo II. Entretanto, a emenda, nesse caso, requer a ação de complexos especializados RNA-proteínas, chamados de ribonucleoproteínas nucleares pequenas (snRNPs — "*s*mall *n*uclear *r*ibo*n*ucleo*p*roteins", chamadas de "snurps"). Cada snRNP contém um de uma classe de RNAs eucarióticos de 100 a 200 nucleotídeos, chamados de **RNAs nucleares pequenos (snRNAs)**. Cinco snRNAs (U1, U2, U4, U5 e U6) envolvidos nas reações de emenda são geralmente encontrados em abundância nos núcleos eucarióticos. Os RNAs e as proteínas nos snRNPs são altamente conservados nos eucariotos, da levedura ao homem.

O snRNA U1 possui uma seqüência complementar às seqüências próximas do sítio de corte 5' dos íntrons dos mRNA nucleares (Fig. 26-16a) e o snRNP U1 se liga a essa região no transcrito primário. A adição dos snRNPs U2, U4, U5 e U6 leva à formação de um complexo chamado de **emendossomo** (**"spliceossome"**), dentro do qual a reação de corte ocorre (Fig. 26-16b). Os snRNPs juntos contribuem com cinco RNAs e cerca de 50 proteínas para o emendossomo, uma montagem supramolecular quase tão complexa quanto o ribossomo (descritos no Capítulo 27). O ATP é requerido para a montagem do emendossomo, mas não há razões para se acreditar que as reações de corte e emenda requeiram ATP. Alguns íntrons dos mRNA são cortados por um tipo de emendossomo menos comum, no qual os snRNPs U1 e U2 são substituídos pelos snRNPs U11 e U12. Os emendossomos usados na emenda do RNA nuclear podem ter se desenvolvido a partir de íntrons mais antigos do grupo II, nos quais os domínios catalíticos dos snRNPs substituem os autocosturáveis de seus ancestrais.

A quarta classe de íntrons, encontrada em certos tRNAs, é distinta dos íntrons dos grupos I e II pelo fato de que a reação de emenda requer o ATP e uma endonuclease (Fig. 26-17). A endonuclease da emenda cliva a ligação fosfodiéster em ambas as extremidades do íntron, e os dois éxons são unidos por um mecanismo semelhante ao da reação da DNA ligase (veja Fig. 25-16).


U1
3'
UCCAψψCAUA
AGGUAGGU
Éxon 5'
U2
5'
AUGAUGU
UACUA C
A
AGGU
Éxon 3'
(a)

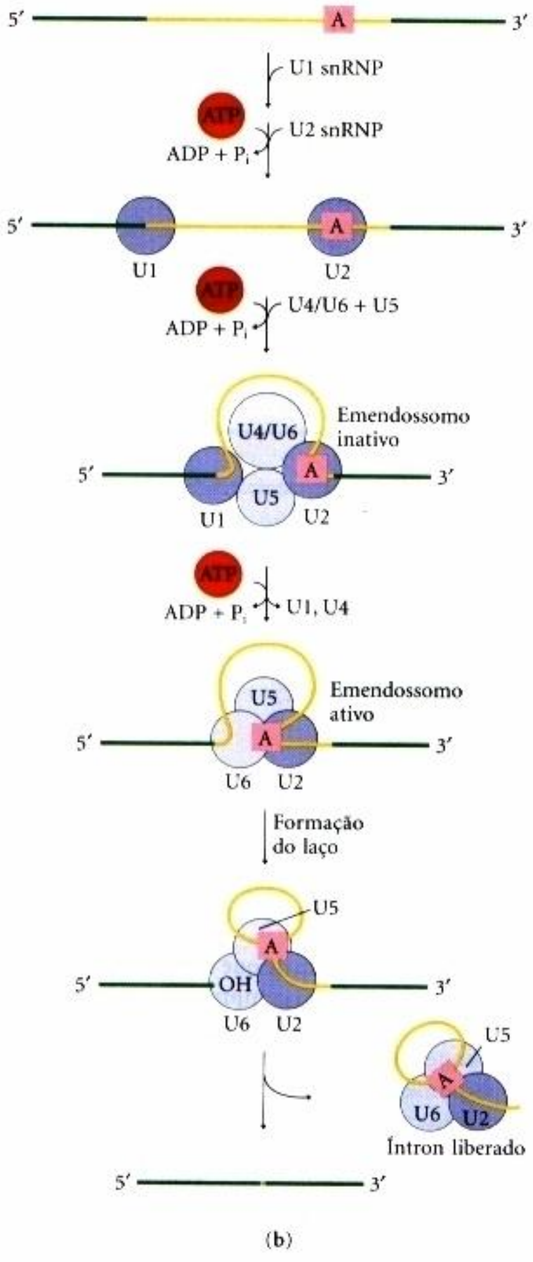
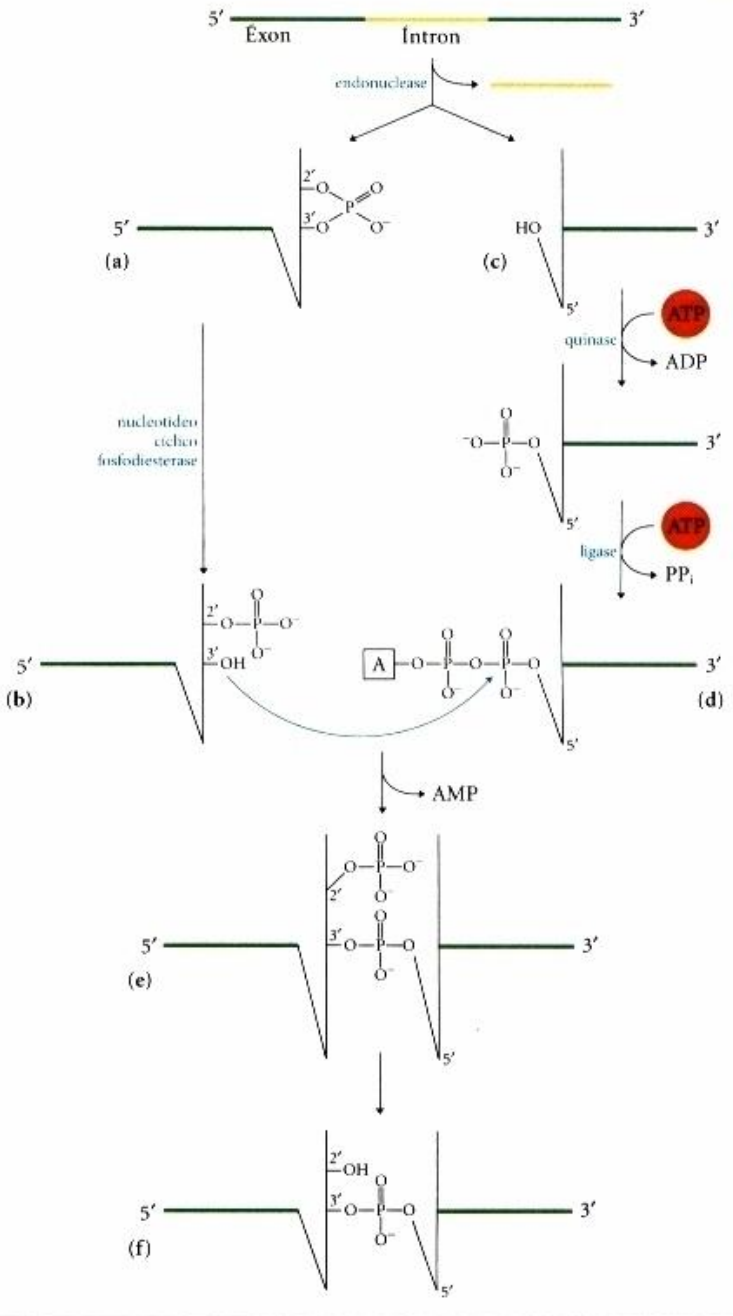

5'
A
3'
U1 snRNP
ATP
ADP + P$_i$
U2 snRNP
5'
A
3'
U1
U2
ATP
ADP + P$_i$
U4/U6 + U5
Emendossomo inativo
U4/U6
5'
A
3'
U5
U1
U2
ATP
ADP + P$_i$
U1, U4
U5
Emendossomo ativo
5'
A
3'
U6
U2
Formação do laço
U5
A
5'
OH
3'
U6
U2
U5
A
U6
U2
Íntron liberado
5'
3'
(b)

Figura 26-16 – Mecanismo da emenda nos transcritos primários de mRNA. (**a**) Interações de pareamento de RNA na formação dos complexos do emendossomo. O snRNA U1 possui uma seqüência próxima da sua extremidade 5' que é complementar ao sítio cortado na extremidade 5' do intron. O pareamento das bases de U1 com essa região do transcrito primário ajuda a definir o sítio de corte 5' durante a montagem do emendossomo (ψ representa a pseudouridina) (veja Fig. 26-26). U2 é pareado ao intron em uma posição que cerca o resíduo de adenosina (em vermelho), que se torna o nucleófilo durante a reação de emenda. O pareamento de bases do snRNA U2 produz uma saliência que desloca e ajuda a ativar a adenosina, cuja hidroxila 2' formará uma estrutura do tipo de laço por meio de uma ligação fosfodiéster 2',5'. (**b**) A montagem dos emendossomos ocorre em várias etapas. Os snRNP U1 e U2 e os remanescentes snRNPs (o complexo U4/U6 e U5) ligam-se para formar um emendossomo inativo. Rearranjos internos convertem essa espécie em um emendossomo ativo, no qual U1 e U4 foram expelidos e U6 está pareado tanto com o sítio de emenda 5' como com U2. Isso é seguido pelas etapas catalíticas, que correm paralelas àquelas da emenda dos introns do grupo II (veja Fig. 26-15).

Figura 26-17 – Emenda do tRNA de levedura. Esse íntron do grupo IV é primeiro removido pela clivagem catalisada pela endonuclease em ambas as extremidades. O fosfato cíclico 2',3' no éxon 5' (**a**) é clivado por uma nucleotídeo fosfodiesterase cíclica, deixando o fosfato 2' (**b**). A OH 5', deixada no éxon 3' (**c**), é ativada em duas etapas, requerendo um co-fator de alta energia (ATP) para formar (**d**). A OH 3', livre do éxon 5', agora age como um nucleófilo para deslocar o AMP do éxon 3', unindo os dois éxons com uma ligação fosfodiéster (**e**). O fosfato 2' é removido para produzir o produto final (**f**).



Embora os íntrons trabalhados pelos emendossomos pareçam ser limitados aos eucariotos, as outras classes de íntrons não o são. Genes com íntrons dos grupos I e II têm sido agora encontrados tanto em bactérias como em vírus bacterianos. O bacteriófago T4, por exemplo, possui vários genes codificadores de proteínas com íntrons do grupo I. Os íntrons parecem ser mais comuns nas arquebactérias (veja pág. 19) do que nas bactérias.

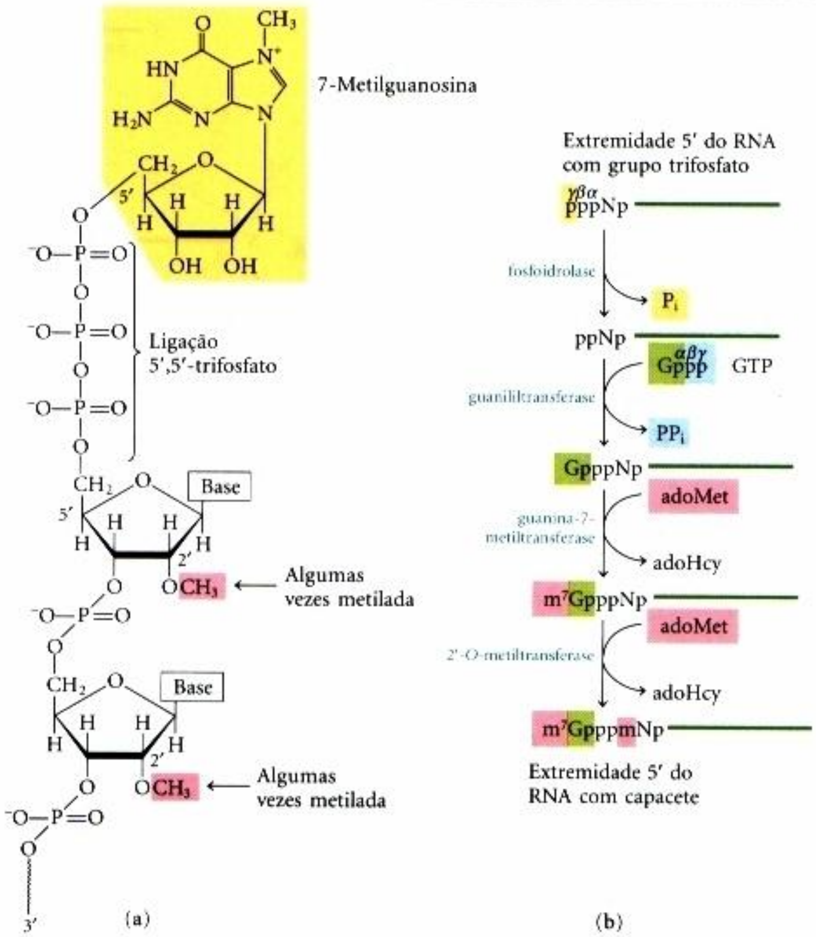
Os mRNAs eucarióticos sofrem processamento adicional

Os mRNAs eucarióticos maduros possuem características estruturais distintas nas duas extremidades. A maioria possui um **capacete 5'**, um resíduo da 7-metilguanosina unido ao resíduo terminal 5' do mRNA por meio de uma ligação incomum 5',5'-trifosfato (Fig. 26-18). Na extremidade 3', a maioria dos mRNAs eucarióticos possui uma "cauda" de 80 a 250 resíduos de adenilato, chamada de **cauda poli(A)**.

As funções do capacete 5' e da cauda poli(A) 3' são apenas parcialmente conhecidas. O capacete 5' liga-se a uma proteína específica e pode participar da ligação do mRNA ao ribossomo para iniciar a tradução (Capítulo 27). A cauda poli(A) também funciona como um sítio de ligação para uma proteína específica. É provável que o capacete 5', a cauda de poli(A) e suas proteínas associadas ajudem a proteger o mRNA da destruição enzimática. Muitos mRNAs procarióticos também possuem caudas poli(A), mas essas caudas facilitam o decaimento do mRNA em vez de protegê-los da degradação.

Ambos os tipos de estruturas terminais são adicionados em várias etapas. O capacete 5' é formado pela condensação de uma molécula de GTP com o trifosfato, na extremidade 5' do transcrito. A guanina é subseqüentemente metilada na N-7, e grupos metila adicionais freqüentemente são adicionados nas hidroxilas 2' do primeiro e segundo nucleotídeos adjacentes ao capacete (Fig. 26-18). Os grupos metila são derivados da *S*-adenosilmetionina.

Figura 26-18 – O capacete 5' do mRNA. (**a**) A 7-metilguanosina é unida à extremidade 5' de quase todos os mRNAs eucarióticos, em uma ligação trifosfato 5',5' não usual. Os grupos metila (em vermelho) são freqüentemente encontrados na posição 2' do primeiro e segundo nucleotídeos. Os RNAs nas células de levedura não possuem os grupos metila 2'. O grupo metila 2' no segundo nucleotídeo é geralmente encontrado apenas nos RNAs de células de vertebrados. (**b**) A formação do capacete 5' envolve quatro a cinco etapas separadas. (A abreviação para a *S*-adenosil-homocisteína é adoHcy.)


7-Metilguanosina
Ligação 5',5'-trifosfato
Base
Base
Algumas vezes metilada
Algumas vezes metilada
(a)
Extremidade 5' do RNA com grupo trifosfato
γβα pppNp
fosfoidrolase
Pi
ppNp
αβγ Gppp
GTP
guanililtransferase
PPi
GpppNp
adoMet
guanina-7-metiltransferase
adoHcy
m7GpppNp
adoMet
2'-O-metiltransferase
adoHcy
m7GpppmNp
Extremidade 5' do RNA com capacete
(b)

A cauda poli(A) é adicionada em um processo de múltiplas etapas. O transcrito estende-se além do sítio no qual a cauda poli(A) deve ser adicionada, e então ele é clivado no sítio de adição da poli(A), por um componente endonucleásico de um grande complexo enzimático (Fig. 26-19). O sítio do mRNA em que ocorre a clivagem é marcado por dois elementos de seqüência: a seqüência altamente conservada (5')AAUAAA(3'), 10 a 30 nucleotídeos no lado 5' (a montante) do sítio de clivagem, e uma seqüência bem menos definida, rica em resíduos de G e U, 20 a 40 nucleotídeos a jusante do sítio de clivagem. A clivagem gera um grupo hidroxila 3' livre que define a extremidade do mRNA, ao qual os resíduos de adenilato são imediatamente adicionados pela **poliadenilato polimerase**, que catalisa a reação

$$\text{RNA} + n\text{ATP} \longrightarrow \text{RNA–(AMP)}_n + n\text{PP}_i$$

onde $n = 80$ a 250. Essa enzima não requer um molde, mas requer que o mRNA clivado seja um iniciador.

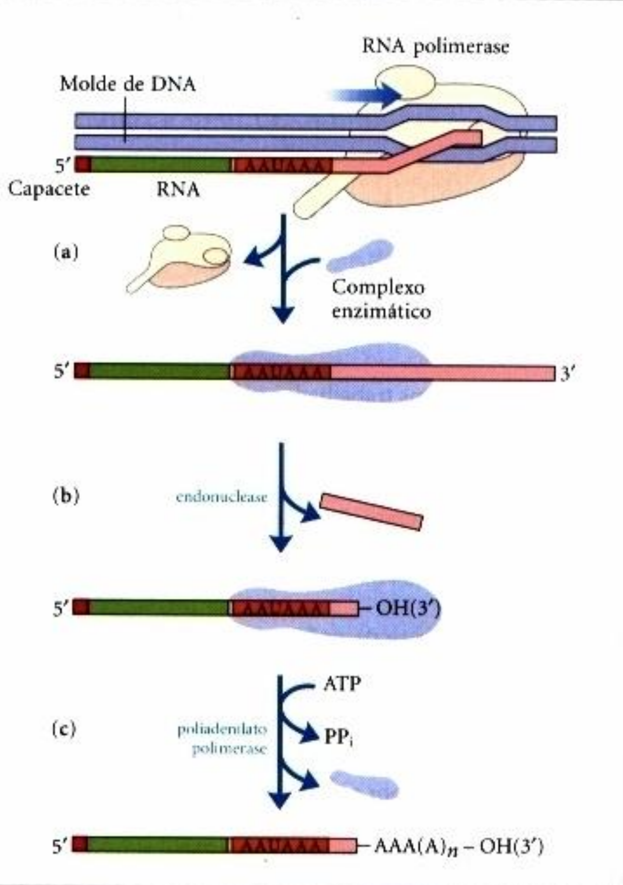

RNA polimerase
Molde de DNA
5'
AAUAAA
Capacete
RNA
(a)
Complexo enzimático
5'
AAUAAA
3'
(b)
endonuclease
5'
AAUAAA
OH(3')
ATP
(c)
poliadenilato polimerase
PPi
5'
AAUAAA
AAA(A)n – OH(3')

Figura 26-19 – Adição da cauda poli(A) ao transcrito primário de RNA dos eucariotos. A RNA polimerase sintetiza RNA além do segmento do transcrito que contém as seqüências sinalizadoras da clivagem, incluindo a seqüência altamente conservada (5')AAUAAA a montante. (**a**) A seqüência sinalizadora da clivagem é ligada por um complexo enzimático que inclui uma endonuclease, uma poliadenilato polimerase e várias outras proteínas com múltiplas subunidades envolvidas no reconhecimento da seqüência, no estímulo da clivagem e na regulação da extensão da cauda poli(A). (**b**) O RNA é clivado pela endonuclease em um ponto 10 a 30 nucleotídeos 3', a jusante da seqüência AAUAAA. (**c**) A poliadenilato polimerase sintetiza uma cauda poli(A) de 80 a 250 nucleotídeos de extensão, começando no sítio de clivagem.

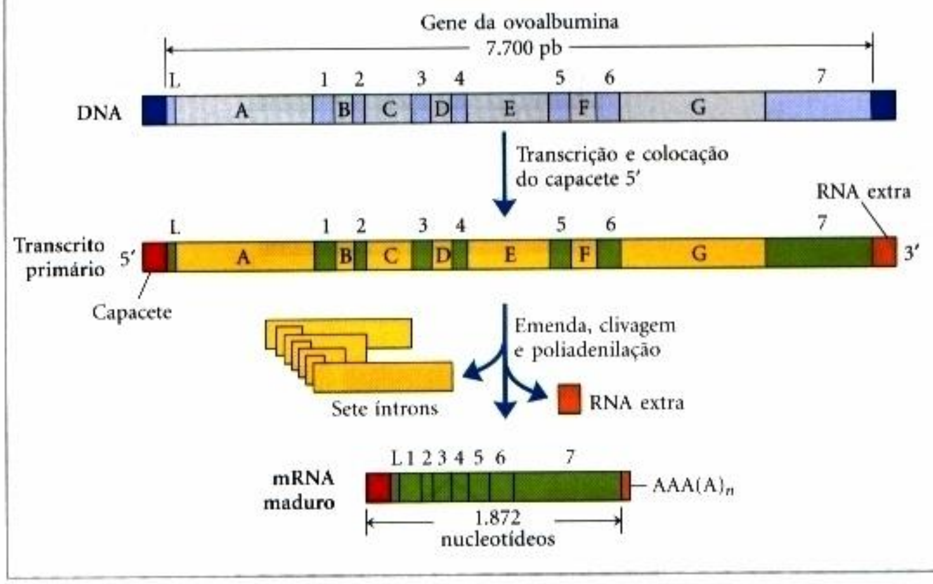


Figura 26-20 – Visão geral do processamento de um mRNA eucariótico. O gene da ovoalbumina é novamente usado como exemplo (veja Fig. 26-12). Os íntrons são assinalados com letras de A a G e os éxons numerados de 1 a 7 e L. Cerca de três quartos do RNA são removidos durante o processamento. A RNA polimerase II estende o transcrito primário bem além dos sítios de clivagem e de poliadenilação ("RNA extra") antes que a transcrição termine. Os sinais de terminação para a RNA polimerase II não foram ainda bem definidos.

O processamento de um mRNA eucariótico típico está esquematizado na Figura 26-20. Em alguns casos, a região codificadora de polipeptídeo do mRNA é também modificada pela "editoração" do RNA (veja Adendo 27-1). Um exemplo particularmente dramático ocorre em um protozoário parasita chamado de tripanossomo: grandes regiões de um mRNA são sintetizadas sem qualquer uridilato, e os resíduos de U são inseridos depois pela editoração do RNA.

Múltiplos produtos são derivados de um gene pelo processamento diferencial do RNA

A transcrição dos íntrons consome recursos celulares e energia, sem retornar nenhum benefício óbvio ao organismo; entretanto, os íntrons podem conferir uma vantagem ainda não considerada pelos cientistas. Os íntrons podem ser vestígios de um parasita molecular não diferente dos transposons considerados no Capítulo 25. Embora esses benefícios não sejam ainda claros na maioria dos casos, as células podem ter se desenvolvido para tirar vantagem das vias de emenda, para alterar a expressão de certos genes.

Embora os transcritos de mRNA eucarióticos, na maioria, produzam apenas um mRNA maduro e um polipeptídeo correspondente, alguns podem ser processados de mais de uma maneira para produzir mRNAs *diferentes* e, portanto, polipeptídeos diferentes. O transcrito primário contém sinais moleculares para todas as vias de processamento alternativo. A via favorecida em uma dada célula é determinada por fatores de processamento, proteínas de ligação ao RNA que promovem uma via particular.

Transcritos complexos podem possuir mais de um sítio para a clivagem e poliadenilação, ou padrões de cortes alternativos, ou ambos (Fig. 26-21). Se houver dois ou mais sítios para a clivagem e a poliadenilação, o uso do mais próximo da extremidade 5′ removerá mais da seqüência do transcrito primário (Fig. 26-21a). Esse mecanismo, chamado de sítio de escolha poli(A), é usado para gerar diversidade nos domínios variáveis das cadeias pesadas de imunoglobulina. Padrões alternativos de corte (Fig. 26-21b) produzem, a partir de um transcrito primário comum, três formas diferentes da cadeia pesada de miosina em diferentes etapas do desenvolvimento da mosca das frutas. *Ambos* os mecanismos entram em ação quando um transcrito primário único é processado de forma diferente, para produzir dois hormônios diferentes: o hormônio calcitonina regulador do cálcio na tireóide do rato, e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina no cérebro do rato (Fig. 26-22).

Os RNAs ribossômicos e de transferência também sofrem processamento

O processamento pós-transcricional não é limitado ao mRNA. Os RNAs ribossômicos, tanto das bactérias quanto das células eucarióticas, são sintetizados a partir de precursores maiores, chamados de **RNAs pré-ribossômicos**. Nas bactérias, os rRNAs 16S, 23S e 5S (e alguns tRNAs) originam-se de um único precursor de RNA 30S, que possui cerca de 6.500 nucleotídeos. O RNA de ambas as extremidades do precursor 30S, e entre os rRNAs, é removido durante o processamento (Fig. 26-23).

O genoma da *E. coli* codifica sete moléculas do pré-rRNA. Todos esses genes possuem regiões codificadoras do rRNA essencialmente idênticas, mas diferem nas regiões entre eles. A região entre os genes para os rRNAs 16S e 23S geralmente codifica um ou dois tRNAs, com diferentes tRNAs originando-se de diferentes transcritos do pré-RNA. As seqüências codificadoras para os tRNAs são também encontradas no lado 3′ do rRNA 5S em alguns transcritos precursores.

Nos eucariotos, um transcrito do RNA pré-ribossômico 45S é processado no nucléolo para formar os rRNAs 18S, 28S e 5,8S, característicos dos ribossomos eucarióticos (Fig. 26-24). O rRNA 5S da maioria dos eucariotos é sintetizado como um transcrito completamente separado por uma polimerase diferente (RNA polimerase III em vez da RNA polimerase I).

A maioria das células possui 40 a 50 tRNAs distintos, e as células eucarióticas possuem múltiplas cópias de muitos dos genes de tRNA. Os RNAs de transferência são derivados de precursores de RNA maiores, pela remoção enzimática das unidades nucleotídicas a partir das extremidades 5′ e 3′ (Fig. 26-25). Nos eucariotos, os íntrons estão ocasionalmente presentes nos transcritos de tRNA e devem ser excisados. Onde dois ou mais tRNAs diferentes estiverem contidos em um único transcrito primário, eles são separados por clivagem enzimática. A RNase P é a endonuclease que remove o RNA na extremidade 5′ dos tRNAs. A extremidade 3′ do tRNA é processada por uma ou mais nucleases, incluindo uma exonuclease chamada de RNase D.

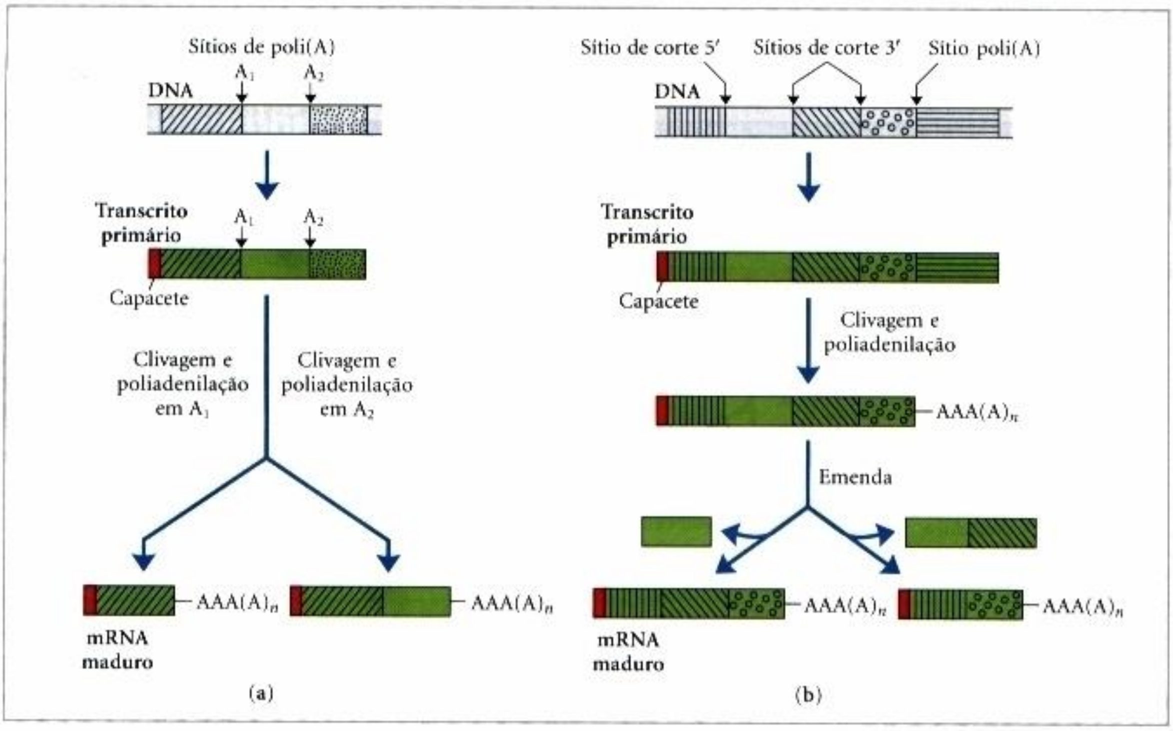

Sítios de poli(A)
A_1
A_2
DNA
Transcrito primário
A_1
A_2
Capacete
Clivagem e poliadenilação em A_1
Clivagem e poliadenilação em A_2
AAA(A)$_n$
AAA(A)$_n$
mRNA maduro
(a)
Sítio de corte 5′
Sítios de corte 3′
Sítio poli(A)
DNA
Transcrito primário
Capacete
Clivagem e poliadenilação
AAA(A)$_n$
Emenda
AAA(A)$_n$
AAA(A)$_n$
mRNA maduro
(b)

Figura 26-21 – Dois mecanismos para o processamento alternativo de transcritos complexos nos eucariotos. (**a**) Clivagem alternativa e padrões de poliadenilação. Dois sítios poli(A), A_1 e A_2, são mostrados. (**b**) Padrões de cortes alternativos. Dois sítios de cortes 3′ diferentes são mostrados. Em ambos os mecanismos, mRNAs maduros diferentes são produzidos a partir do mesmo transcrito primário.

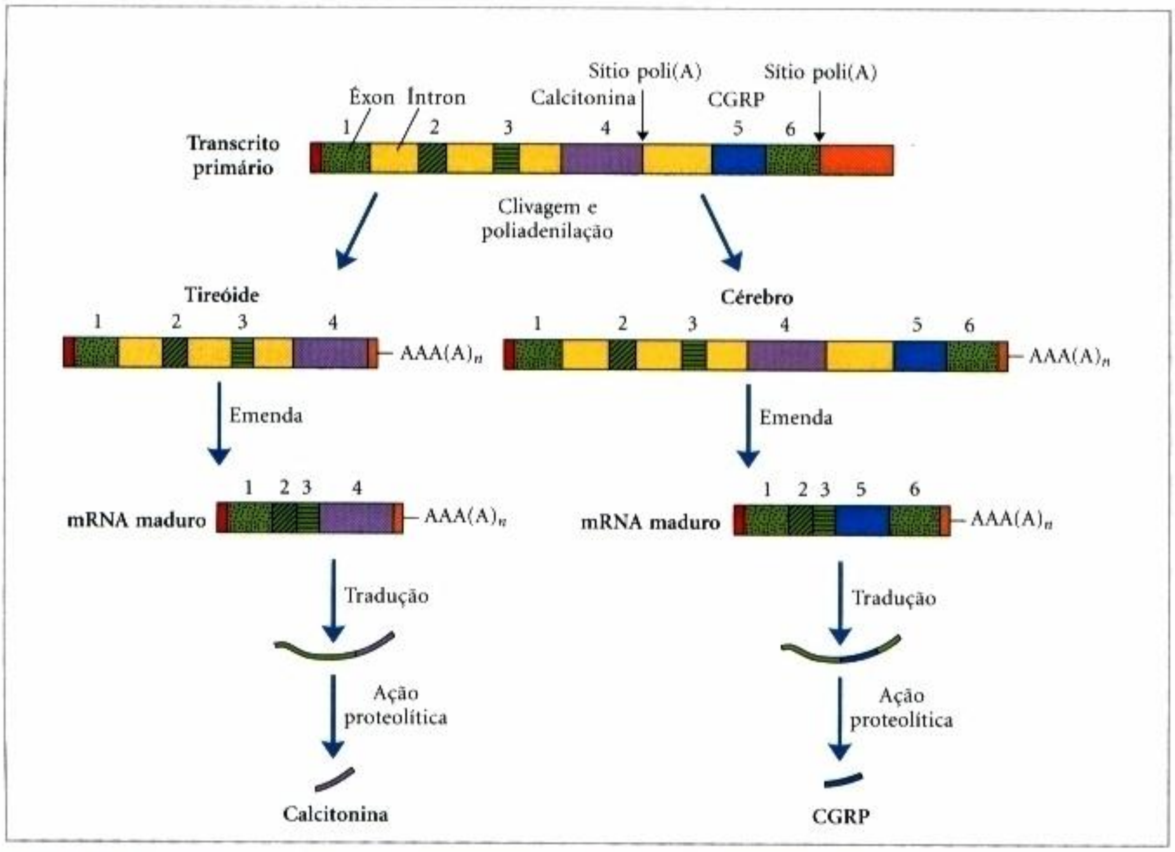

Sítio poli(A)
Sítio poli(A)
Éxon
Íntron
Calcitonina
CGRP
1
2
3
4
5
6
Transcrito primário
Clivagem e poliadenilação
Tireóide
1
2
3
4
AAA(A)$_n$
Cérebro
1
2
3
4
5
6
AAA(A)$_n$
Emenda
Emenda
mRNA maduro
1 2 3 4
AAA(A)$_n$
mRNA maduro
1 2 3 5 6
AAA(A)$_n$
Tradução
Tradução
Ação proteolítica
Ação proteolítica
Calcitonina
CGRP

Figura 26-22 – Processamento alternativo do transcrito do gene da calcitonina em ratos. O transcrito primário possui dois sítios poli(A); um predomina no cérebro, o outro, na tireóide. No cérebro, o corte elimina o éxon calcitonina (éxon 4); na tireóide, esse éxon é retido. Os peptídeos resultantes são processados mais para produzir os produtos hormonais finais: o peptídeo relacionado à calcitonina (CGRP — "calcitonin gene-related peptide") no cérebro e à calcitonina na tireóide.

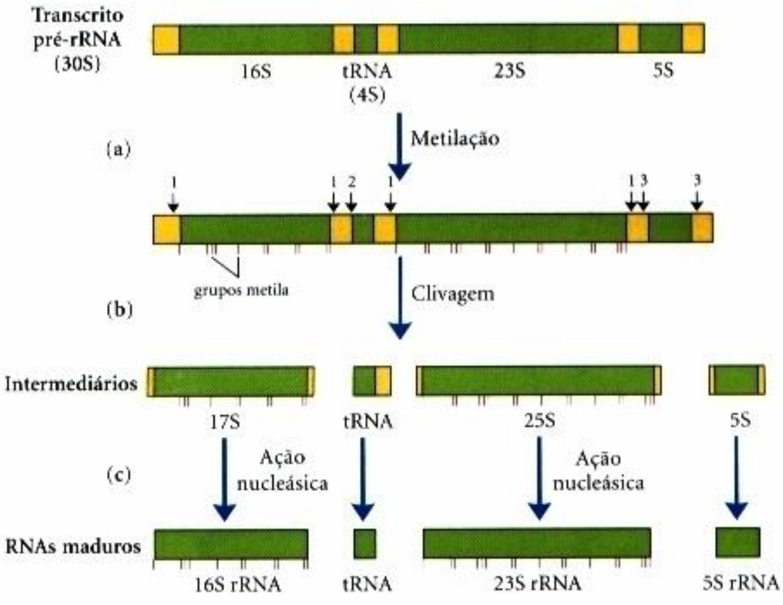

Transcrito pré-rRNA (30S)
16S
tRNA (4S)
23S
5S
(a)
Metilação
1
1 2
1
1 3
3
grupos metila
(b)
Clivagem
Intermediários
17S
tRNA
25S
5S
(c)
Ação nucleásica
Ação nucleásica
RNAs maduros
16S rRNA
tRNA
23S rRNA
5S rRNA

Figura 26-23 – Processamento de transcritos de pré-rRNA nas bactérias. (**a**) Antes da clivagem, o precursor do RNA 30S é metilado em bases específicas. (**b**) A clivagem libera precursores dos rRNAs e tRNA(s). As clivagens nos pontos marcados com 1, 2 e 3 é realizada pelas enzimas RNase III, RNase P e RNase E, respectivamente. Como será discutido mais adiante neste texto, a RNase P é uma ribozima. (**c**) Os produtos finais dos rRNA 16S, 23S e 5S resultam da ação de uma variedade de nucleases específicas. As sete cópias do gene para o pré-rRNA no cromossomo da *E. coli* diferem no número, na localização e na identidade dos tRNAs incluídos no transcrito primário. Algumas cópias do gene possuem segmentos adicionais de genes tRNA entre os segmentos de rRNA 16S e 23S e na distante extremidade 3' do transcrito primário.

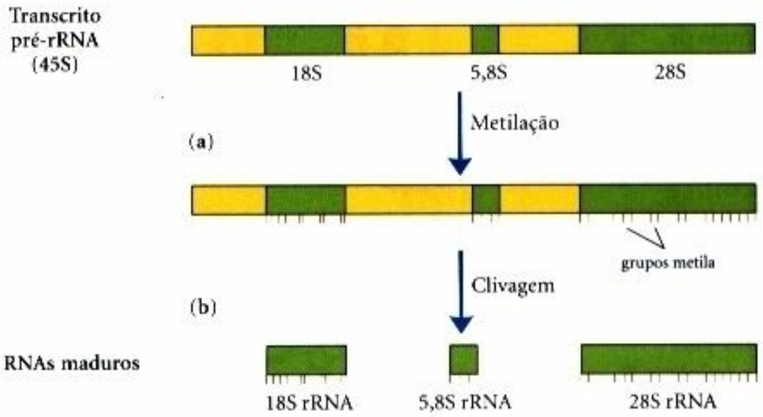

Transcrito pré-rRNA (45S)
18S
5,8S
28S
(a)
Metilação
grupos metila
(b)
Clivagem
RNAs maduros
18S rRNA
5,8S rRNA
28S rRNA

Figura 26-24 – Processamento de transcritos de pré-rRNA em vertebrados. (**a**) O precursor 45S é metilado em mais de 100 dos seus 14.000 nucleotídeos, principalmente nos grupos OH-2' das unidades de ribose retidas nos produtos finais. (**b**) Uma série de clivagens enzimáticas produz os rRNAs 18S, 5,8S e 28S. As reações de clivagem requerem RNAs encontrados no nucléolo, chamados de RNAs nucleares pequenos (snRNAs), dentro de complexos protéicos reminescentes dos emendossomos. O rRNA 5S é produzido separadamente.

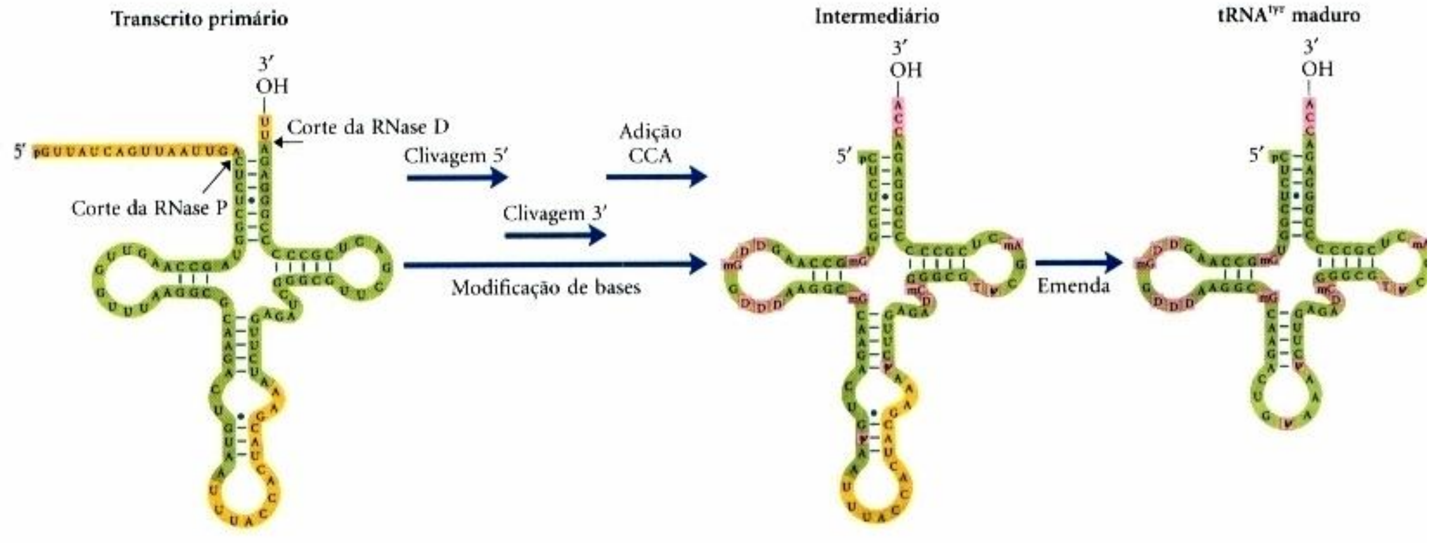
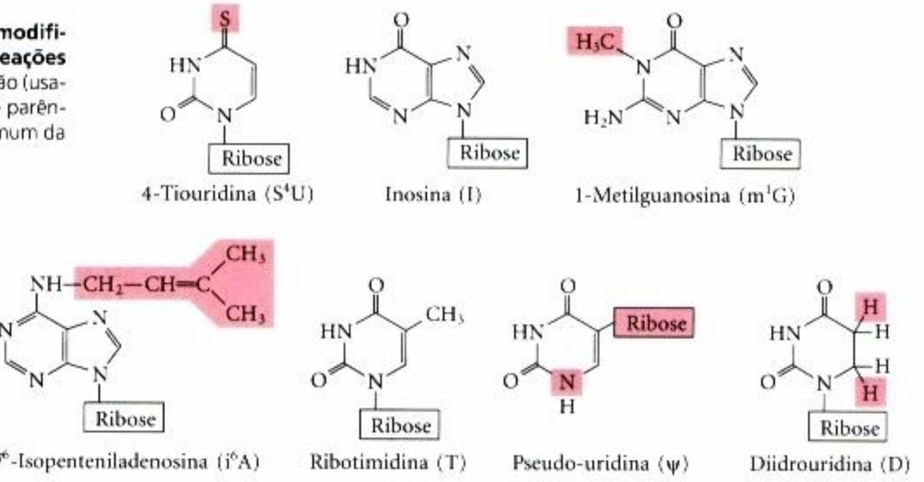

Transcrito primário
3′ OH
5′ pGUUAUCAGUUAAUUGA
Corte da RNase D
Corte da RNase P
Clivagem 5′
Adição CCA
Clivagem 3′
Modificação de bases
Intermediário
3′ OH
5′
Emenda
tRNA^{Tyr} maduro
3′ OH
5′

Figura 26-25 – Processamento dos tRNAs nas bactérias e nos eucariotos. O tRNA^{Tyr} de levedura (o tRNA específico para a ligação da tirosina) é usado para ilustrar as etapas importantes. As seqüências de nucleotídeo mostradas em amarelo são removidas do transcrito primário. As extremidades são processadas primeiro, a extremidade 5′ antes da extremidade 3′. O CCA é, então, adicionado à extremidade 3′, uma etapa necessária no processamento dos tRNAs eucarióticos e daqueles tRNAs bacterianos que não possuem essa seqüência no transcrito primário. Enquanto essas extremidades estão sendo processadas, bases específicas no resto do transcrito são modificadas (veja Fig. 26-26). Para o tRNA eucariótico mostrado aqui, a etapa final é o corte do íntron de 14 nucleotídeos. Íntrons são encontrados em alguns tRNAs eucarióticos, mas não em tRNAs bacterianos.

Figura 26-26 – Algumas das bases modificadas dos tRNAs, produzidas nas reações pós-transcricionais. Os símbolos-padrão (usados na Fig. 26-25) são mostrados entre parênteses. Observe o ponto de ligação incomum da ribose na pseudo-uridina.



A RNase P, encontrada em todos os organismos, contém tanto proteína quanto RNA. O componente RNA é essencial para a atividade, e, em células bacterianas, ele pode desempenhar sua função processante com precisão, mesmo na ausência do componente protéico. A RNAse P é, portanto, um outro exemplo de RNA catalítico, como será descrito com mais detalhes a seguir.

Os precursores dos tRNAs podem sofrer um outro processamento pós-transcricional. O trinucleotídeo 3′ terminal CCA(3′), ao qual um aminoácido será ligado durante a síntese de proteínas (Capítulo 27), está ausente em algumas bactérias e em todos os precursores tRNA eucarióticos, e é adicionado durante o processamento (Fig. 26-25). Essa adição é realizada pela tRNA nucleotidiltransferase, uma enzima não usual que liga os três ribonucleosídeos trifosfatos precursores em sítios ativos separados e catalisa a formação das ligações fosfodiésteres para produzir a seqüência CCA(3′). A criação dessa seqüência definida de nucleotídeos é, portanto, independente de um molde de DNA ou RNA — o molde é o sítio de ligação da enzima.

O tipo final de processamento do tRNA é a modificação de algumas das bases por metilação, deaminação ou redução (Fig. 26-26). No caso da pseudo-uridina (ψ), a base (uracila) é removida e religada ao açúcar por meio C-5. Algumas dessas bases modificadas ocorrem em posições características em todos os tRNAs (Fig. 26-25).

Alguns eventos no metabolismo do RNA são catalisados por enzimas de RNA

O estudo do processamento pós-transcricional das moléculas de RNA levou a uma das mais excitantes descobertas da bioquímica moderna — a existência de enzimas de RNA. As ribozimas mais bem caracterizadas são os íntrons autocosturáveis do grupo I, a RNase P e a ribozima cabeça-de-martelo. A maioria das atividades dessas ribozimas está baseada em duas reações fundamentais: transesterificação (veja Fig. 26-13) e hidrólise da ligação fosfodiéster (clivagem). O substrato para as ribozimas é freqüentemente uma molécula de RNA, e pode até mesmo ser parte da própria ribozima. Quando seu substrato é RNA, um catalisador de RNA pode fazer uso das interações de pareamento de bases para alinhar o substrato para a reação.

As ribozimas variam muito em tamanho. Um íntron autocosturável do grupo I pode ter mais de 400 nucleotídeos. A ribozima cabeça-de-martelo consiste em duas fitas de RNA, com um total de apenas 41 nucleotídeos (Fig. 26-27). Da mesma for-

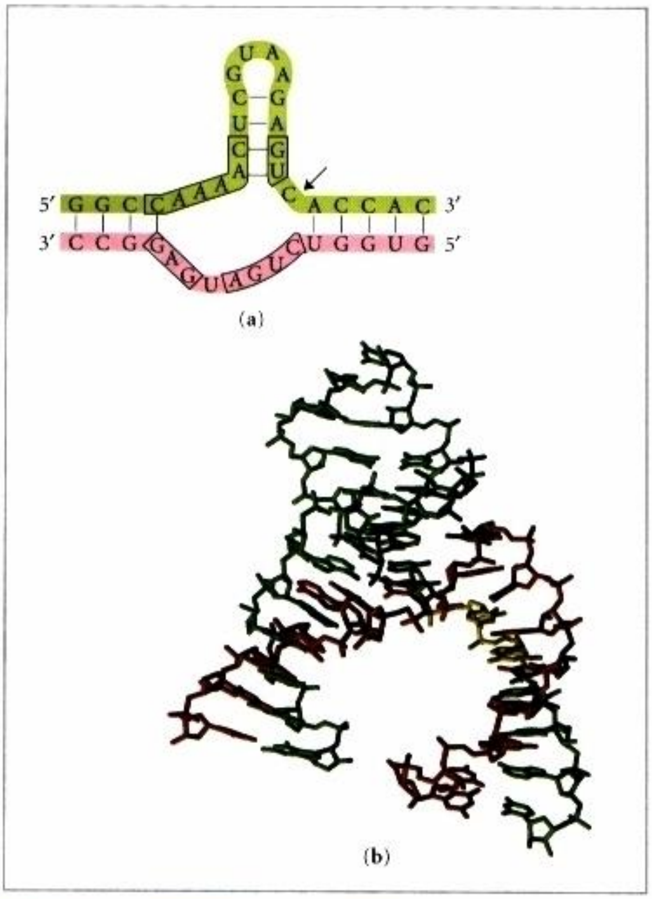


Figura 26-27 – Ribozima cabeça-de-martelo. Certos elementos semelhantes ao vírus, chamados de virusóides, possuem pequenos genomas de RNA e usualmente requerem um outro vírus para ajudá-los na sua replicação e/ou empacotamento. Alguns RNAs virusóides incluem pequenos segmentos que promovem reações de clivagem sítio-específicas associadas à replicação. Esses segmentos são chamados de ribozimas cabeça-de-martelo, porque suas estruturas secundárias têm a forma da cabeça de um martelo. As ribozimas cabeça-de-martelo têm sido definidas e estudadas separadamente de RNA virais, que são muito maiores. (**a**) As seqüências mínimas requeridas para a catálise. Os nucleotídeos enquadrados são altamente conservados e requeridos para a função catalítica. A seta indica o sítio de autoclivagem. (**b**) Estrutura tridimensional. As fitas são coloridas como em (**a**). A ribozima cabeça-de-martelo é uma metaloenzima; íons Mg^{2+} são requeridos para a catálise. A ligação fosfodiéster no sítio de autoclivagem está entre os dois resíduos de nucleotídeos mostrados em amarelo.

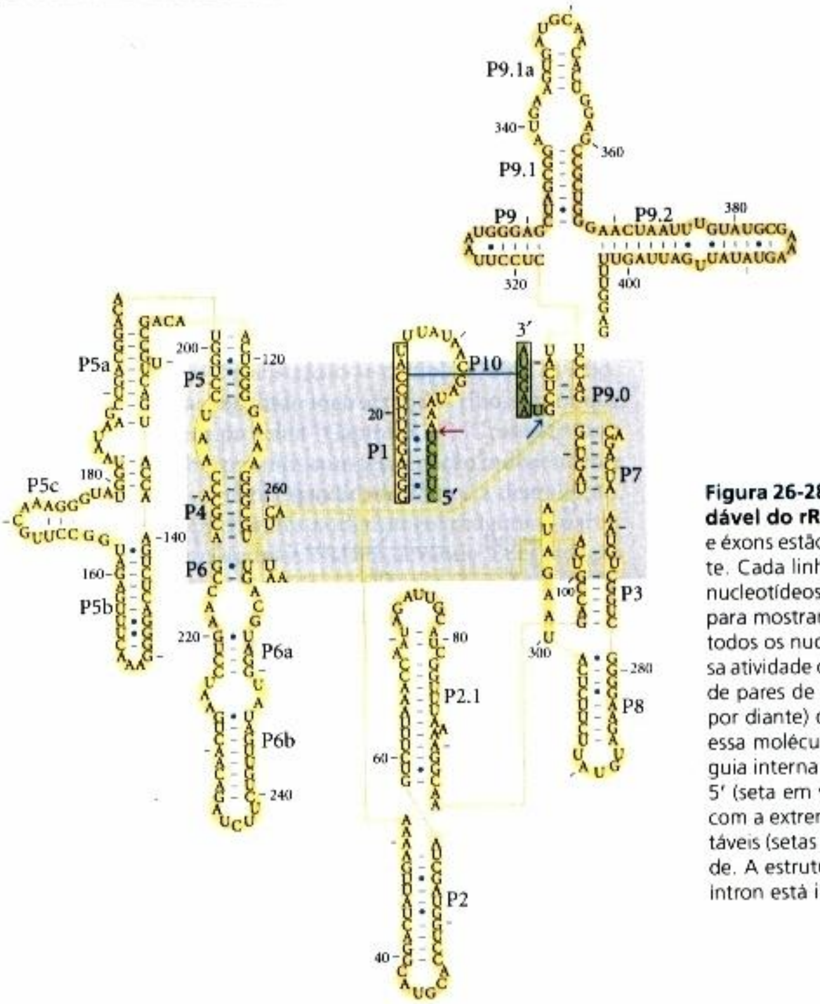


Figura 26-28 – Estrutura secundária do íntron auto-emendável do rRNA da *Tetrahymena*. As seqüências dos íntrons e éxons estão sombreadas em amarelo e verde, respectivamente. Cada linha amarela espessa representa uma ligação entre nucleotídeos vizinhos, em uma seqüência contínua (necessária para mostrar essa molécula complexa em duas dimensões) — todos os nucleotídeos são mostrados. O núcleo catalítico dessa atividade de auto-emenda está sombreado. Algumas regiões de pares de bases estão marcadas (P1, P3, P2.1, P5a, e assim por diante) de acordo com uma convenção estabelecida para essa molécula de RNA. A região P1, que contém a seqüência guia interna (enquadrada), é a localização do sítio de emenda 5′ (seta em vermelho). Parte da seqüência guia interna parea com a extremidade do éxon 3′, fazendo com que os sítios cortáveis (setas em vermelho e azul) fiquem em íntima proximidade. A estrutura tridimensional de um grande segmento desse íntron está ilustrada na Figura 10-28d.

ma que as enzimas protéicas, a estrutura tridimensional da ribozima é importante para a função. A atividade se perde se o RNA for aquecido além da temperatura de fusão, se agentes desnaturantes ou oligonucleotídeos complementares forem adicionados, o que rompe os padrões normais de pareamento de bases. As ribozimas podem também ser inativadas se nucleotídeos essenciais forem alterados. A estrutura secundária de um íntron autocortável do grupo I do precursor 26S rRNA de *Tetrahymena* é mostrada em detalhe na Figura 26-28.

Propriedades enzimáticas dos íntrons do grupo I. Os íntrons autocortáveis do grupo I compartilham várias propriedades com enzimas, além de acelerar muito a velocidade da reação, incluindo seus comportamentos cinéticos e sua grande especificidade. A ligação do co-fator guanosina ao íntron do grupo I do rRNA da *Tetrahymena* é saturável ($K_m \approx 30\mu M$), e pode ser competitivamente inibida pela 3′-desoxiguanosina. O íntron é muito preciso na reação de excisão, principalmente devido a um segmento chamado de **seqüência guia interna**, que pode formar pares de bases com seqüências de éxon próximas ao sítio de emenda 5′ (Fig. 26-28). Esse pareamento promove o alinhamento de ligações específicas para que sejam clivadas e rejuntadas.

Pelo fato de o próprio íntron ser quimicamente alterado por ter suas extremidades clivadas durante a reação de emenda, pode parecer que ele não tenha uma propriedade enzimática chave: a habilidade de catalisar reações múltiplas. Uma inspeção mais atenta mostrou que, depois da excisão, o íntron de 414 nucleotídeos do rRNA da *Tetrahymena* pode, *in vitro*, agir como uma verdadeira enzima (*in vivo* ele é rapidamente degradado). Uma série de reações intramoleculares de ciclização/clivagem no íntron excisado leva à perda de 19 nucleotídeos, a partir da sua extremidade 5′. O RNA linear remanescente de 395 nucleotídeos, chamado de L-19 IVS, promove reações de transferência de nucleotídeos, nas quais alguns oligonucleotídeos são alongados a expensas de outros (Fig. 26-29). Os melhores substratos são oligonucleotídeos, por exemplo, um oligômero sintético de cinco citidilatos $(C)_5$, que pode formar pareamento de base com a mesma seqüência guia interna rica em guanilato, que mantinha o éxon 5′ no lugar para a auto-emenda.

A atividade enzimática do L-19 IVS resulta de um ciclo de reações de transesterificação, com mecanismo semelhante ao da auto-emenda. Cada ribozima pode processar cerca de 100 moléculas de substrato por hora e não ser alterada na reação; portanto, o íntron atua como um catalisador. Ele segue a cinética de Michaelis-Menten, é específico para substratos oligonucleotídeos de RNA e pode ser inibido competitivamente. A k_{cat}/K_m (a constante de especificidade) é $10^3 M^{-1}s^{-1}$ menor que a de muitas enzimas, mas essa ribozima acelera a hidrólise por um fator de 10^{10}, relativamente à reação não-catalisada. A ribozima faz uso da orientação do substrato, da catálise covalente e da catálise metal-íon — estratégias usadas por enzimas protéicas.

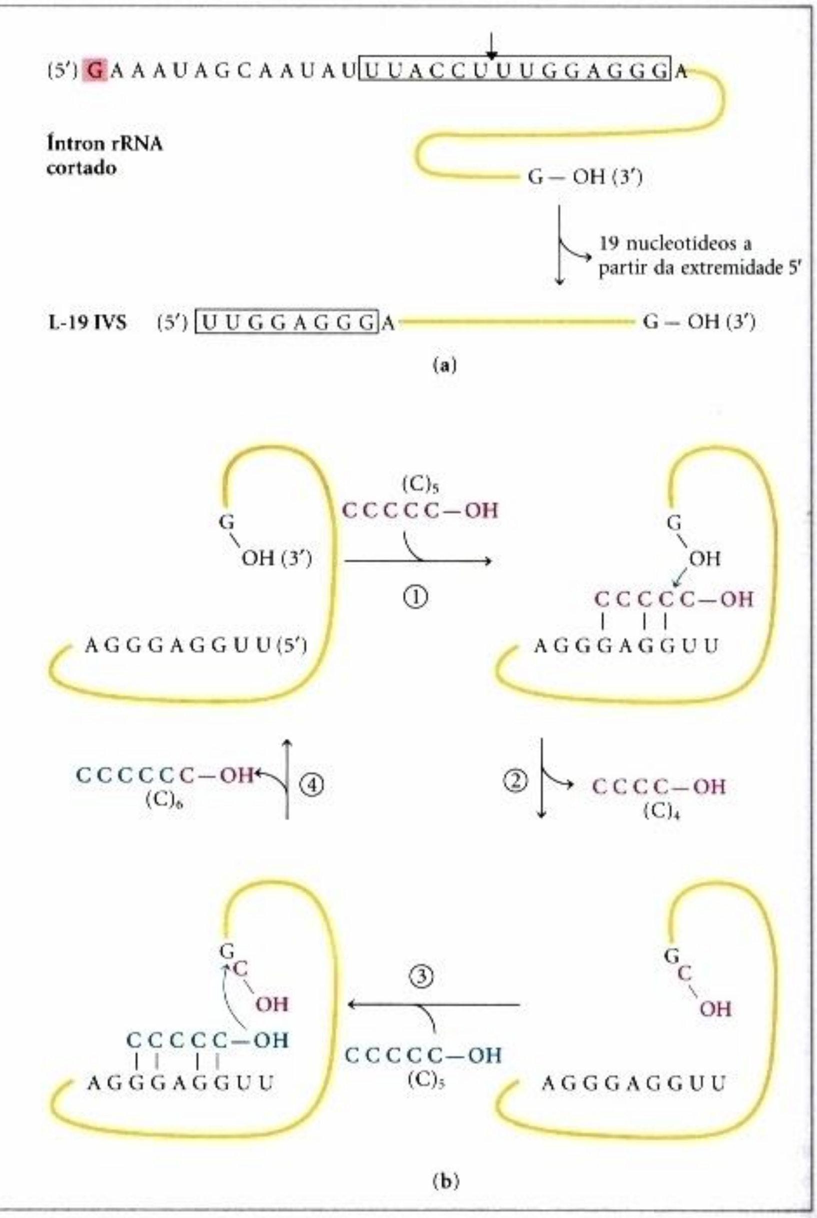


Figura 26-29 – Atividade catalítica *in vitro* da L-19 IVS. (**a**) A L-19 IVS é gerada pela remoção autocatalítica de 19 nucleotídeos da extremidade 5′ do íntron cortado da *Tetrahymena*. O sítio de clivagem está indicado pela seta na seqüência guia interna (enquadrada). O resíduo G (sombreado em vermelho), adicionado na primeira etapa da reação de emenda (veja Fig. 26-14), é parte da seqüência removida. Uma porção da seqüência guia interna permanece na extremidade 5′ da L-19 IVS. (**b**) A L-19 IVS aumenta alguns oligonucleotídeos a expensas de outros, em um ciclo de reações de transesterificação (etapas ① a ④). A OH 3′ do resíduo G na extremidade 3′ da L-19 IVS desempenha um papel-chave nesse ciclo de reações (observe que esse *não* é o resíduo adicionado na reação de emenda). $(C)_5$ é um dos melhores substratos da ribozima, porque ele pode parear as bases com a seqüência guia remanescente no íntron. Embora essa atividade catalítica seja provavelmente irrelevante para a célula, ela tem implicações importantes para as hipóteses atuais sobre a evolução, discutidas no final deste capítulo.

Características de outras ribozimas. A RNase P da *E. coli* possui um componente RNA (o M1 RNA, 377 nucleotídeos) e um componente protéico (M_r 17.500). Em 1983, Sidney Altman e Norman Pace e seus colaboradores descobriram que, sob algumas condições, o M1 RNA sozinho era suficiente para a catálise, clivando os precursores do tRNA na posição correta. O componente protéico aparentemente estabiliza o RNA ou facilita sua função *in vivo*. A ribozima RNase P reconhece a forma tridimensional do seu substrato pré-tRNA junto com a seqüência CCA e, portanto, pode clivar as extremidades líderes 5′ de diversos tRNAs (Fig. 26-25).

O repertório catalítico das ribozimas continua a se expandir. Alguns viróides, pequenos RNAs associados a vírus de RNA de plantas, incluem uma estrutura que promove uma reação de auto-emenda. A ribozima cabeça-de-martelo, ilustrada na Figura 26-27, é uma delas, catalisando a hidrólise de uma ligação fosfodiéster interna. Acredita-se que a reação de emenda que ocorre em um emendossomo dependa de um centro catalítico, formado pela U2, U5 e U6 snRNAs (Fig. 26-16). Também, um componente RNA dos ribossomos (Capítulo 27) pode participar da catálise da síntese protéica.

A exploração dos RNAs catalíticos tem fornecido novas idéias para a função catalítica em geral e tem implicações importantes para a nossa compreensão sobre a origem e a evolução da vida neste planeta, um tópico que discutiremos no final deste capítulo.

Os mRNAs celulares são degradados em velocidades diferentes

A expressão dos genes é regulada em muitos níveis. Um fator crucial que governa uma expressão gênica é a concentração celular do seu mRNA associado. A concentração de qualquer molécula depende de dois fatores: a sua velocidade de síntese e a sua velocidade de degradação. Quando a síntese e a degradação de um mRNA estiverem balanceadas, sua concentração permanece em um equilíbrio estacionário. Uma alteração em qualquer velocidade levará a um acúmulo ou depleção do mRNA. As vias degradativas garantem que os mRNAs não se formem na célula e direcionem a síntese de proteínas desnecessárias.

As velocidades de degradação variam muito nos mRNAs de diferentes genes eucarióticos. Para um produto gênico que seja necessário apenas momentaneamente, a meia-vida do seu mRNA pode ser de apenas minutos, ou mesmo segundos. Produtos gênicos necessitados constantemente pela célula podem ter mRNAs que sejam estáveis por muitas gerações de células. A meia-vida média de um mRNA de uma célula de vertebrado é de cerca de 3 horas, com a quantidade de cada mRNA se renovando cerca de dez vezes em cada geração de célula. A meia-vida dos mRNAs bacterianos é de apenas cerca de 1,5 minuto, talvez relacionada com os requerimentos regulatórios.

O RNA é degradado pelas ribonucleases presentes em todas as células, usualmente em uma direção 5'→3', embora exorribonucleases 3'→5' também existam. mRNAs estáveis carregam uma seqüência em suas extremidades 3', que inibe as exorribonucleases. Nas bactérias, a degradação do mRNA freqüentemente começa quase tão logo a transcrição se completa, com as ribonucleases degradativas seguindo logo atrás dos ribossomos que traduzem o mRNA em proteína (Capítulo 27). Uma estrutura grampo nos mRNAs bacterianos com terminação independente de ρ (veja Fig. 26-7) confere estabilidade contra a degradação. Estruturas grampo semelhantes podem tornar algumas partes de um transcrito primário mais estáveis, levando à degradação não uniforme de alguns transcritos policistrônicos. Nas células eucarióticas, a cauda poli(A) 3' é importante para a estabilidade de muitos mRNAs. Uma via degradativa principal nas células eucarióticas envolve, primeiro, o encurtamento da cauda poli(A), depois a retirada do capacete da extremidade 5'e a degradação do RNA na direção 5'→3'.

A polinucleotídeo fosforilase sintetiza aleatoriamente polímeros do tipo RNA

Em 1955, Marianne Grunberg-Manago e Severo Ochoa descobriram a enzima bacteriana **polinucleotídeo fosforilase**, que *in vitro* catalisa a reação:

$$(\mathrm{NMP})_n + \mathrm{NDP} \rightleftharpoons \underset{\substack{\text{Polinucleotídeo} \\ \text{alongado}}}{(\mathrm{NMP})_{n+1}} + \mathrm{P_i}$$

A polinucleotídeo fosforilase foi a primeira enzima encontrada que sintetizava ácido nucléico (a descoberta da DNA polimerase por Arthur Kornberg seguiu-se logo depois). A reação catalisada pela polinucleotídeo fosforilase difere fundamentalmente das outras atividades polimerizantes discutidas até agora, pelo fato de ela não ser direcionada por molde. A enzima requer ribonucleosídeos 5'-difosfatos como substratos e não consegue agir em homólogos 5'-trifosfatos, ou em desoxirribonucleosídeos 5'-difosfatos. O polímero de RNA formado pela polinucleotídeo fosforilase contém ligações fosfodiésteres 3',5' normais, que podem ser hidrolisadas pela ribonuclease. A reação é facilmente reversível e pode ser empurrada na direção da quebra do polirribonucleotídeo, aumentando a concentração do fosfato. A provável função dessa enzima na célula é a degradação dos mRNAs para formar nucleosídeos difosfatos.

Marianne Grunberg-Manago

Severo Ochoa
1905-1993

Pelo fato de a reação da polinucleotídeo fosforilase não usar um molde, o polímero que ela forma não possui uma seqüência de bases definida. A reação prossegue bem, não apenas com um nucleosídeo difosfato mas com todos os quatro, e a composição da base do polímero resultante reflete nada mais do que as concentrações relativas dos substratos 5'-difosfatos no meio.

A polinucleotídeo fosforilase pode ser usada no laboratório para preparar polímeros de RNA, com seqüências e freqüências de bases muito diferentes. Polímeros de RNA sintéticos dessa espécie foram críticos para a dedução do código genético para os aminoácidos (Capítulo 27).

Síntese de RNA e DNA Dependente de RNA

Em nossa discussão das sínteses do RNA e DNA até este ponto, o papel da fita molde tem sido reservado ao DNA. Entretanto, algumas enzimas usam um molde de RNA para a síntese dos ácidos nucléicos. Com a exceção muito importante dos vírus com um genoma de RNA, essas enzimas desempenham apenas um modesto papel nas vias da informação. Os vírus de RNA são a fonte da maioria das polimerases dependentes de RNA caracterizadas até então.

A existência da replicação do RNA requer uma elaboração do dogma central descrito anteriormente (Fig 26-30, contrastando com o diagrama na pág. 712). As enzimas envolvidas na replicação do RNA são extremamente úteis na tecnologia do DNA recombinante (Capítulo 29) e têm profundas implicações nas investigações sobre a natureza das moléculas auto-replicantes que podem ter existido nos tempos pré-bióticos.

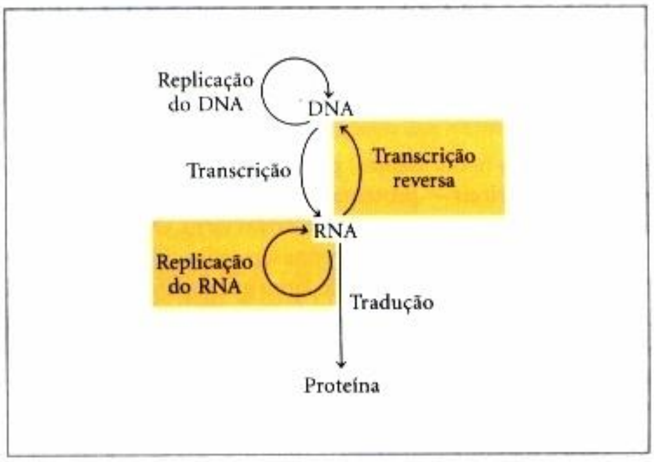


Figura 26-30 – Extensão do dogma central para incluir as sínteses de RNA e DNA dependentes de RNA.

A transcriptase reversa produz DNA a partir do RNA viral

Certos vírus de RNA que infectam as células animais carregam, dentro da partícula viral, uma DNA polimerase dependente de RNA, chamada de **transcriptase reversa**. Em uma infecção, o genoma viral de RNA de fita simples (~10.000 nucleotídeos de comprimento) e a enzima entram na célula hospedeira. A transcriptase reversa primeiro catalisa a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNA viral (Fig. 26-31), depois ela degrada a fita de RNA no híbrido RNA-DNA viral e a substitui por DNA. A fita de DNA dúplex assim formada freqüentemente se incorpora ao genoma da célula eucariótica hospedeira. Esses genes vi-

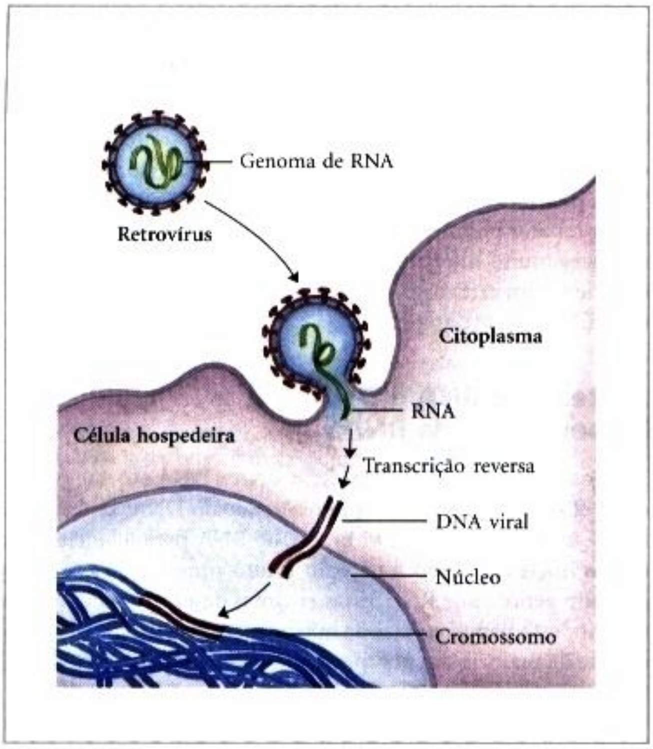


Figura 26-31 – Infecção retroviral de uma célula de mamífero e integração do retrovírus no cromossomo hospedeiro. A integração do DNA viral no DNA hospedeiro é mecanicamente semelhante à inserção dos transposons nos cromossomos bacterianos (Fig. 25-41). Por exemplo, uns poucos pares de bases do DNA hospedeiro são duplicados no sítio de integração, formando repetições curtas de 4 a 6 pares de bases em cada extremidade do DNA retroviral inserido (não mostrado). As partículas virais que entram na célula hospedeira carregam a transcriptase reversa viral e um tRNA celular (adquirido de uma célula hospedeira anterior) já pareado ao RNA viral. O tRNA facilita a conversão imediata do RNA viral à fita dupla de DNA, como descrito no texto.

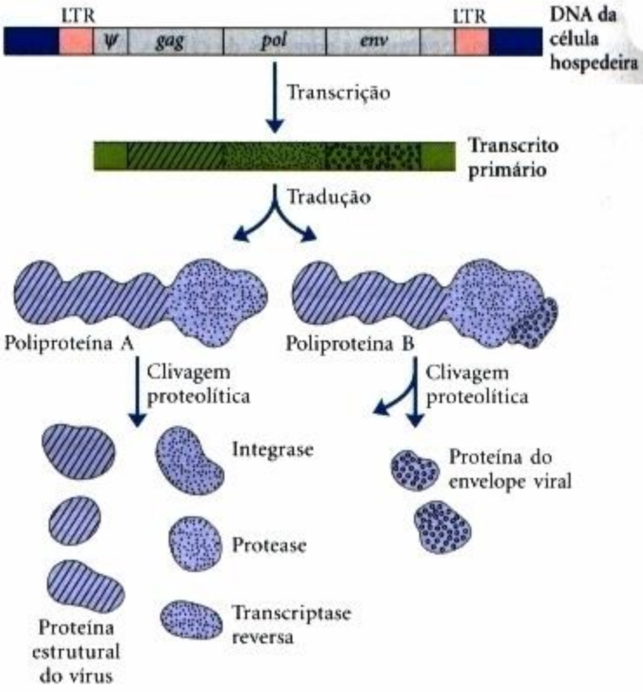


Figura 26-32 – Estrutura e produtos gênicos de um genoma de retrovírus integrado. Os longos terminais de repetições (LTRs) possuem seqüências necessárias para a regulação e iniciação da transcrição. A seqüência denotada como ψ é requerida para empacotar os RNAs retrovirais em partículas virais maduras. A transcrição do DNA retroviral produz um transcrito primário que inclui os genes *gag*, *pol* e *env*. A tradução (Capítulo 27) produz uma poliproteína, um polipeptídeo longo e único, derivado dos genes *gag* e *pol*, que é proteoliticamente clivado em seis proteínas diferentes. A emenda do transcrito primário produz um mRNA derivado principalmente do gene *env*, que é também traduzido como uma poliproteína e depois clivado para gerar as proteínas do envelope viral.

rais integrados (e dormentes) podem ser ativados e transcritos, e os produtos virais — proteínas virais e o próprio genoma viral do RNA — são empacotados como novos vírus. Os vírus de RNA que contêm as transcriptases reversas são conhecidos como **retrovírus** (*retro* é prefixo de origem do latim que significa "para trás").

A existência das transcriptases reversas nos vírus de RNA foi predita em 1962 por Howard Temin, e as enzimas foram finalmente detectadas por Temin e, independentemente, por David Baltimore, em 1970. Essa descoberta chamou muito a atenção como prova antidogmática de que a informação genética pode fluir "retroativamente" do RNA para o DNA.

Howard Temin
(1934-1994)

David Baltimore

Os retrovírus possuem tipicamente três genes: *gag* (derivado da designação inglesa "*g*roup *a*ssociated anti*g*en"), *pol* e *env* (Fig. 26-32). O transcrito que contém *gag* e *pol* é traduzido como uma longa "poliproteína", um polipeptídeo grande e único, que é clivado em seis proteínas com funções distintas. As proteínas derivadas do gene *gag* compõem o interior do núcleo da partícula viral. O gene *pol* codifica a protease que cliva o polipeptídeo longo, uma integrase que insere o DNA viral no cromossomo da célula hospedeira, e a transcriptase reversa. Muitas transcriptases reversas freqüentemente possuem duas subunidades, α e β. O gene *pol* especifica a subunidade β (M_r 90.000), e a subunidade α (M_r 65.000) é simplesmente um fragmento proteolítico da subunidade β. O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral. Em cada extremidade do genoma de RNA linear estão seqüências terminais de repetições longas (LTR — "*l*ong *t*erminal *r*epeat") de algumas centenas de nucleotídeos. Transcritas dentro do DNA dúplex, essas seqüências facilitam a integração do cromossomo viral no DNA hospedeiro e contêm promotores para a expressão dos genes virais.

As transcriptases reversas virais possuem Zn^{2+}, da mesma forma que muitas DNA e RNA polimerases. Cada transcriptase é mais ativa com o RNA do seu próprio vírus, mas pode ser usada experimentalmente para sintetizar DNA complementar a uma variedade de RNAs. A transcriptase reversa catalisa três reações diferentes: (1) síntese do DNA dependente de RNA, (2) degradação do RNA e (3) síntese do DNA dependente de DNA. As atividades de síntese do DNA/RNA e a degradação do RNA utilizam sítios ativos separados na proteína. Para a síntese de DNA começar, a transcriptase reversa requer um iniciador, um tRNA celular carregado dentro da partícula viral, mas obtido durante uma infecção anterior. Esse tRNA é pareado na sua extremidade 3' com uma seqüência complementar do RNA viral. A nova fita de DNA é sintetizada na direção 5'→3', como em todas as reações das RNA e DNA polimerases. As transcriptases reversas, como as RNA polimerases, não possuem uma exonuclease revisora 3'→5'. Elas geralmente apresentam índices de erro de um a cada 20.000 nucleotídeos adicionados. Um índice de erro tão elevado é extremamente incomum na replicação do DNA e parece ser uma característica da maioria das enzimas que replicam os genomas dos vírus de RNA. A conseqüência é um índice mais acelerado de evolução viral, o que é um fator no aparecimento freqüente de novas cepas de retrovírus causadores de doenças.

As transcriptases reversas têm se tornado reagentes importantes no estudo das relações DNA-RNA e na clonagem de DNA. Elas tornam possível a síntese laboratorial de um DNA complementar a um molde de mRNA, e o DNA sintético, preparado dessa maneira, chamado de **DNA complementar (cDNA)**, pode ser usado para clonar genes celulares (veja Fig. 29-9).

Os retrovírus causam o câncer e a AIDS

Os retrovírus têm desempenhado papel importante nos avanços recentes sobre o entendimento molecular do câncer. A maioria dos retrovírus não mata as suas células hospedeiras, mas permanece integrada ao DNA celular, replicando quando a célula se divide. Alguns retrovírus, classificados como vírus tumorais de RNA, contêm um oncogene que pode induzir a célula a crescer anormalmente (veja Fig. 13-36). O primeiro retrovírus desse tipo a ser estudado foi o vírus do sarcoma de Rous (também chamado de vírus do sarcoma de aves; Fig. 26-33), nomeado em homenagem a Peyton Rous, que estudou tumores em galinhas, hoje sabemos que eles são induzidos por esses vírus. Desde a descoberta inicial dos oncogenes por Harold Varmus e Michael Bishop, muitas dúzias desses genes têm sido encontradas nos retrovírus.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), que ocasiona a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), é um retrovírus. Identificado em 1983, o HIV possui um genoma de RNA com genes-padrão retrovirais, junto com vários outros genes incomuns (Fig. 26-34). Ao contrário de muitos outros vírus, o HIV mata muitas das células que infecta (principalmente linfócitos T), em vez de induzir a formação de tumores. Isso gradualmente leva à supressão do sistema imune no organismo hospedeiro. A transcriptase reversa do HIV é ainda mais sujeita a erros do que outras transcriptases reversas conhecidas — dez vezes ou mais —, resultando em altas taxas de mutações nesse vírus. Um ou mais erros são geralmente feitos cada vez que o genoma viral é replicado, de forma tal que quaisquer duas moléculas do RNA viral quase sempre diferem.

As vacinas modernas para as infecções virais freqüentemente consistem de uma ou mais proteínas da capa do vírus, produzidas por métodos descritos no Capítulo 29. Essas proteínas não são infecciosas por si próprias, mas estimulam o sistema imune a reconhecer e a resistir às invasões virais subseqüentes (Capítulo 7). Por causa do alto índice de erro da transcriptase reversa do HIV, o gene *env* nesse vírus (juntamente com o resto do genoma) sofre mutação muito rapidamente, tornando difícil o desenvolvimento de uma vacina efetiva. Entretanto, ciclos repetidos de invasão e replicação celulares são necessários para propagar uma infecção pelo HIV, de forma que a inibição das enzimas virais promete ser uma terapia efetiva. A protease do HIV é o objetivo de uma classe de drogas chamadas de inibidores da protease (veja Adendo 8-3). A transcriptase reversa é o alvo de algumas drogas adicionais, largamente usadas para tratar os indivíduos infectados com o HIV (Adendo 26-2).

Muitos transposons, retrovírus e íntrons podem ter uma origem evolucionária comum

Alguns transposons bem caracterizados de DNA eucariótico, de fontes tão diversas como a levedura e a mosca das frutas, possuem uma estrutura muito semelhante àquela dos retrovírus; estes são,

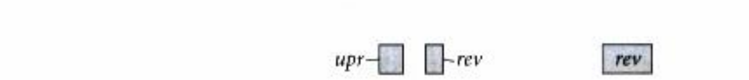


Figura 26-33 – O genoma do vírus do sarcoma de Rous. O gene *src* codifica uma proteína quinase tirosina específica, uma de uma classe de enzimas conhecidas por funcionar em sistemas que afetam a divisão celular, as interações célula-célula e as comunicações intercelulares (veja Capítulo 13). O mesmo gene é encontrado no DNA de galinhas normais e nos genomas de muitos outros eucariotos, incluindo o homem. Quando associado ao vírus do sarcoma de Rous, esse oncogene é freqüentemente expresso em níveis anormalmente altos, contribuindo para desregular a divisão celular e para o câncer.

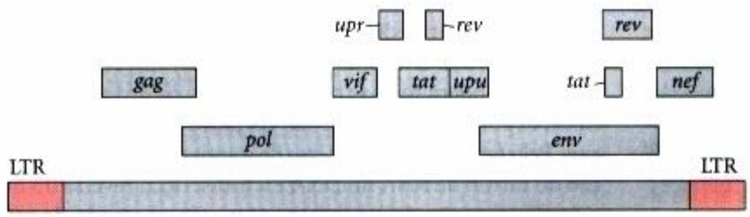


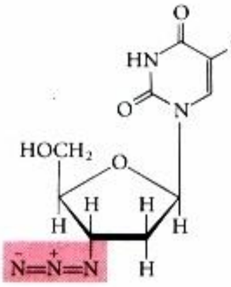
Figura 26-34 – O genoma do HIV, o vírus que causa a AIDS. Além dos genes retrovirais típicos, o HIV contém vários genes pequenos com uma variedade de funções (não identificadas aqui, e nem todas conhecidas). Alguns desses genes se sobrepõem (Capítulo 27). Mecanismos alternativos de emenda levam à produção de muitas proteínas diferentes, a partir desse pequeno genoma ($9{,}7 \times 10^6$ nucleotídeos).

Adendo 26-2 Lutando contra a AIDS com inibidores da transcriptase reversa do HIV

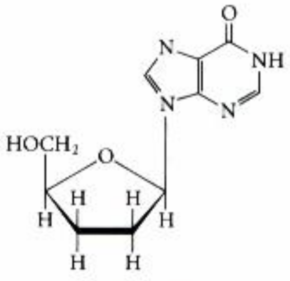
A pesquisa na química da biossíntese dos ácidos nucléicos dependentes de molde, combinada a técnicas modernas da biologia molecular, tem elucidado o ciclo de vida e a estrutura do vírus da imunodeficiência humana (HIV), o retrovírus que causa a AIDS. Poucos anos após o isolamento do HIV, essa pesquisa resultou no desenvolvimento de drogas capazes de prolongar a vida daquelas pessoas infectadas pelo HIV.

A primeira droga a ser aprovada para uso clínico foi o AZT, um análogo estrutural da desoxitimidina. Ele foi primeiramente sintetizado em 1964, por Jerome P. Horwitz. O AZT falhou como droga anticancerígena (o propósito para o qual foi criado), mas, em 1985, descobriu-se que era um tratamento efetivo para a AIDS. O AZT é captado pelos linfócitos T, células do sistema imune que são particularmente vulneráveis à infecção pelo HIV, e convertido em AZT trifosfato. O trifosfato não pode ser oferecido diretamente, porque ele não atravessa a membrana plasmática. A transcriptase reversa do HIV possui uma afinidade maior com o AZT trifosfato do que com o dTTP, e a ligação do AZT trifosfato a essa enzima inibe competitivamente a ligação do dTTP. Quando o AZT é adicionado à extremidade 3′ da fita crescente de RNA, ele não possui uma hidroxila 3′, o que significa que a fita de RNA é prematuramente terminada e a síntese do RNA viral rapidamente interrompida.

O AZT trifosfato não é tão tóxico para os próprios linfócitos T, porque as DNA polimerases *celulares* possuem uma afinidade menor com o AZT trifosfato do que com o dTTP. Nas concentrações de 1 a 5μM, o AZT afeta a transcriptase reversa do HIV, mas não a maioria das replicações do DNA das células. Infelizmente, a droga parece ser tóxica para as células da medula óssea, que são os progenitores dos eritrócitos, e os pacientes que tomam o AZT freqüentemente desenvolvem anemia. O AZT pode aumentar o tempo de sobrevivência dos pacientes com AIDS avançada, por cerca de um ano, e ele retarda o início da AIDS em indivíduos que ainda estejam nas etapas iniciais da infecção pelo HIV. Algumas outras drogas contra a AIDS, como a didesoxiinosina, possuem um mecanismo de ação semelhante. Drogas mais recentes são direcionadas à protease do HIV e a inativam. Por causa do alto índice de erro da transcriptase reversa do HIV e a rápida evolução do HIV como resultado, tratamentos efetivos das infecções pelo HIV fazem uso de uma combinação de drogas direcionadas tanto à protease quanto à transcriptase reversa.



3′-Azido-2′,3′-didesoxitimidina (AZT)



2′,3′-Didesoxiinosina (DDI)

algumas vezes, chamados de retrotransposons (Fig. 26-35). Os retrotransposons codificam uma enzima homóloga à transcriptase reversa retroviral, e as suas regiões codificadoras são flanqueadas por seqüências LTR. Eles saltam de uma posição para outra no genoma celular, por meio de um intermediário de RNA, provavelmente usando a transcriptase reversa para fazer uma cópia de DNA do RNA, seguindo-se pela integração do DNA em um novo sítio. A maioria dos transposons nos eucariotos provavelmente usa esse mecanismo para a transposição, distinguindo-se dos transposons bacterianos, que se movem como DNA, diretamente de uma localização cromossômica para outra (veja Fig. 25-41).

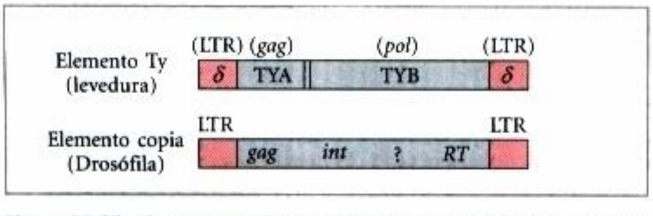


Figura 26-35 – Os transposons eucarióticos. O elemento Ty da levedura *Saccharomyces* e o elemento copia da mosca das frutas drosófilas servem como exemplos de transposons eucarióticos, que freqüentemente possuem uma estrutura semelhante ao retrovírus, mas não possuem o gen *env*. As seqüências δ do elemento Ty são funcionalmente equivalentes às LTRs virais. No elemento copia, *int* e *RT* são homólogos aos segmentos da integrase e da transcriptase reversa do gene *pol*, respectivamente.

Os retrotransposons não possuem um gene *env* e, dessa forma, não podem formar partículas virais. Eles podem ser imaginados como vírus defectivos, presos em células. Comparações entre os retrovírus e os transposons eucarióticos sugerem que a transcriptase reversa seja uma enzima antiga, que precede a evolução dos organismos multicelulares.

Curiosamente, muitos íntrons dos grupos I e II são também elementos genéticos móveis. Além de suas atividades de auto-emenda, eles codificam, no DNA, endonucleases que promovem a sua movimentação. Durante as trocas genéticas entre células da mesma espécie, ou quando o DNA é introduzido em uma célula por parasitas ou outros meios, essas endonucleases promovem a inserção do íntron dentro de um sítio idêntico em uma outra cópia de DNA de um gene homólogo que não contenha o íntron, em um processo chamado de **internalização** (**"homing"**) (Fig. 26-36). Enquanto o íntron residente do grupo I se baseia no DNA, o íntron residente do grupo II ocorre por meio de um RNA intermediário. As endonucleases dos íntrons do grupo II possuem a atividade de transcriptase reversa associada. As proteínas podem formar complexos com os próprios íntrons de RNA, depois que os íntrons são cortados dos transcritos primários. Pelo fato de que o processo de internalização envolve a inserção do íntron de RNA no DNA e a transcrição reversa do íntron, a movimentação desses íntrons tem sido chamada de retrointernalização. Com o tempo, cada cópia de um gene particular

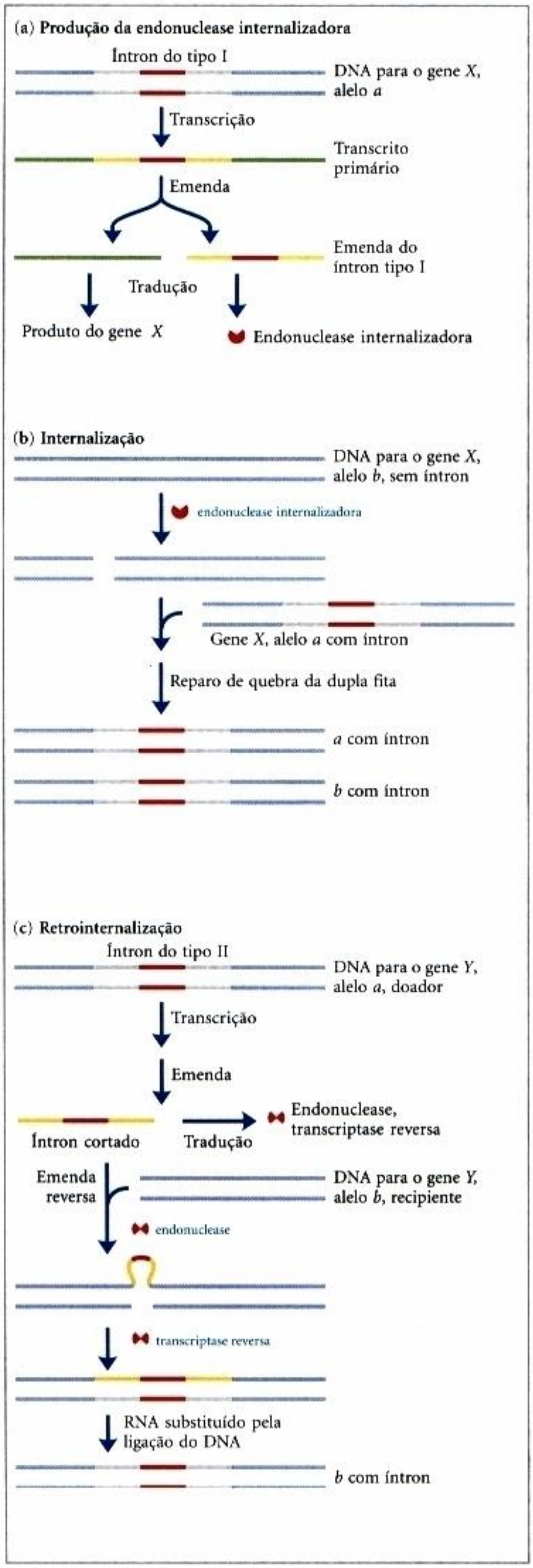

(a) Produção da endonuclease internalizadora
Íntron do tipo I
DNA para o gene X, alelo a
Transcrição
Transcrito primário
Emenda
Emenda do íntron tipo I
Tradução
Produto do gene X
Endonuclease internalizadora
(b) Internalização
DNA para o gene X, alelo b, sem íntron
endonuclease internalizadora
Gene X, alelo a com íntron
Reparo de quebra da dupla fita
a com íntron
b com íntron
(c) Retrointernalização
Íntron do tipo II
DNA para o gene Y, alelo a, doador
Transcrição
Emenda
Endonuclease, transcriptase reversa
Íntron cortado
Tradução
Emenda reversa
DNA para o gene Y, alelo b, recipiente
endonuclease
transcriptase reversa
RNA substituído pela ligação do DNA
b com íntron

Figura 26-36 – Íntrons que se movem: internalização e retrointernalização. Certos íntrons incluem um gene (mostrado em vermelho) para enzimas que promovem a internalização (íntrons do tipo I) ou retrointernalização (íntrons do tipo II). **(a)** O gene contido no íntron cortado é ligado a um ribossomo e traduzido. Íntrons residentes do tipo I especificam uma endonuclease sítio-específica, chamada de endonuclease de internalização. Os íntrons de residentes do tipo II especificam uma proteína com ambas as atividades de endonuclease e transcriptase reversa. **(b)** Internalização. O alelo *a* de um gene *X* que contém um íntron de residente do tipo I está presente em uma célula que contém o alelo *b* do mesmo gene, que não possui o íntron. A endonuclease de internalização produzida por *a* cliva *b*, na posição correspondente ao íntron em *a*, e o reparo com quebra das duas fitas (recombinação com o alelo *a*, veja Fig. 25-29a) depois cria uma nova cópia do íntron em *b*. **(c)** Retrointernalização. O alelo *a* de um gene Y contém um íntron residente do tipo II; o alelo *b* não possui o íntron. O íntron cortado se insere, ele próprio, na fita codificadora de *b*, em uma reação que é a reversa do corte que excisou o íntron do transcrito primário (veja Fig. 26-15), exceto que aqui a inserção está dentro do DNA e não do RNA. A fita não-codificadora de *b* é, então, clivada pelo íntron que codifica a endonuclease/transcriptase reversa. Essa mesma enzima usa o RNA inserido como um molde para sintetizar uma fita de DNA complementar. O RNA é então degradado pela ribonuclease celular e substituído pelo DNA.

em uma população pode adquirir o íntron. Muito mais raramente, o íntron pode se inserir, ele próprio, em uma outra localização em um gene não relacionado. Mesmo que esse evento não mate a célula hospedeira, ele pode levar à evolução e à distribuição de um íntron em nova localização. As estruturas e os mecanismos usados pelos íntrons móveis apóiam a idéia de que pelo menos alguns íntrons se originaram como parasitas moleculares, cujo passado evolucionário pode ser achado nos retrovírus e transposons.

A telomerase é uma transcriptase reversa especializada

Os telômeros, estruturas especializadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos lineares (veja Fig. 24-3), geralmente consistem de muitas cópias repetidas de uma seqüência oligonucleotídea curta. Essa seqüência usualmente tem a forma T_xG_y em uma fita e C_yA_x na fita complementar, onde *x* e *y* tipicamente caem no intervalo de 1 a 4 (veja pág. 715). Os telômeros variam em comprimento, desde algumas dúzias de pares de bases em alguns protozoários ciliados, até dezenas de milhares de pares de bases nos mamíferos. A fita TG é maior do que a sua complementar, deixando uma região de DNA de fita simples de até algumas centenas de nucleotídeos na extremidade 3'.

As extremidades de um cromossomo linear não são facilmente replicadas pelas DNA polimerases celulares. A replicação do DNA requer um molde e um iniciador, mas, acima da extremidade de uma molécula de DNA linear, nenhum molde é disponível para o pareamento de um RNA iniciador. Sem um mecanismo especial para a replicação das extremidades, os cromossomos seriam encurtados, de alguma forma, em cada geração celular. A enzima telomerase resolve esse problema ao adicionar telômeros às extremidades do cromossomo.

Embora a existência dessa enzima possa não ser surpreendente, o mecanismo pelo qual ela age é extraordinário e sem precedentes. A telomerase, como algumas outras enzimas descritas neste capítulo, contém componentes tanto de RNA quanto de proteína. O componente de RNA tem cerca de 150 nucleotídeos de comprimento e contém cerca de 1,5 cópia do telômero de repetição C_yA_x. Essa região do RNA age como um molde para a síntese da fita T_xG_y do telômero. A telomerase, portanto, age como uma transcriptase reversa celular que fornece o sítio ativo para uma síntese de DNA dependente de RNA. Ao contrário da transcriptase reversa retroviral, a telomerase copia somente um pequeno segmento de RNA que ela carrega dentro dela mesma. A síntese do telômero requer a extremidade 3′ de um cromossomo como iniciador e prossegue na direção usual 5′→3′. Tendo sintetizado uma cópia da repetição, a enzima se repõe para reiniciar a extensão do telômero (Fig. 26-37).

Acredita-se que a fita complementar C_yA_x seja sintetizada pela DNA polimerase celular que começa com um iniciador de RNA. A região de fita simples é protegida por proteínas de ligação específicas em muitos eucariotos inferiores, especialmente aquelas espécies com telômeros menores do que algumas centenas de pares de bases. Nos eucariotos superiores (incluindo os mamíferos), com telômeros de muitos milhares de pares de bases de comprimento, a extremidade da fita simples é seqüestrada em uma estrutura especializada, chamada de **alça T**. A extremidade da fita simples é dobrada de volta e parea com seu complemento na porção da fita dupla do telômero. A formação de uma alça T envolve a invasão da extremidade 3′ da fita simples do telômero no DNA dúplex, talvez por um mecanismo semelhante ao da iniciação da recombinação genética homóloga (Capítulo 25). Nos mamíferos, a alça do DNA está ligada por duas proteínas chamadas de TRF1 e TRF2, com a última proteína envolvida na formação da alça T. As alças T protegem as extremidades 3′ dos cromossomos, tornando-as inacessíveis às nucleases e às enzimas que reparam quebras de fitas duplas.

Em protozoários (tais como a *Tetrahymena*), a perda da atividade da telomerase resulta no encurtamento gradual dos telômeros a cada divisão celular, levando, finalmente, à morte da linhagem celular. Uma associação semelhante entre o comprimento do telômero e o envelhecimento celular (cessação da divisão celular) tem sido observada no homem. Nas células da linhagem germinativa, que contêm a atividade telomerásica, os comprimentos dos telômeros são mantidos; nas células somáticas, que não possuem a telomerase, eles não o são. Há uma relação linear e inversa entre o comprimento dos telômeros em cultura de fibroblastos e a idade do indivíduo do qual os fibroblastos foram retirados: os telômeros nas células somáticas humanas

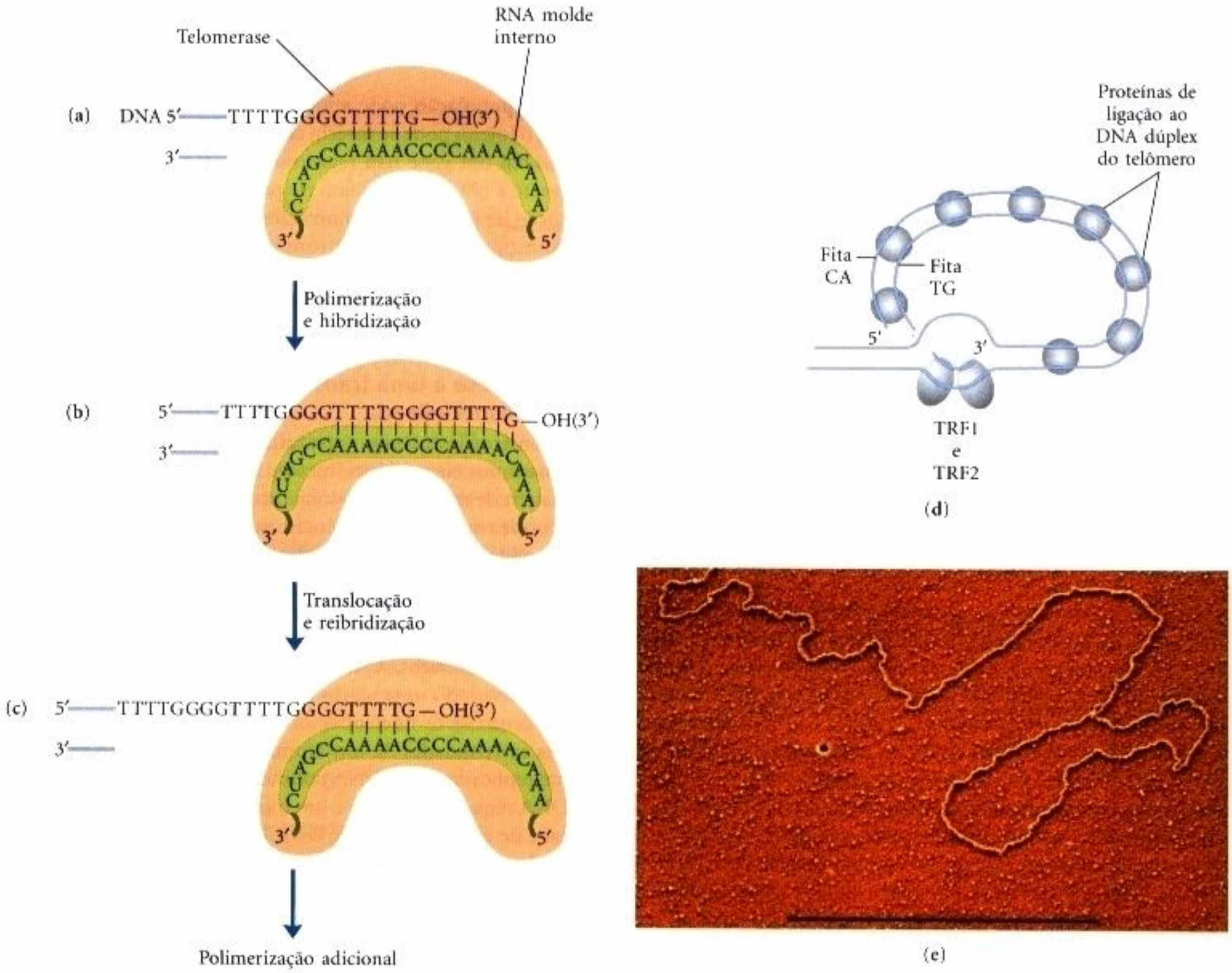

Telomerase
RNA molde interno
(a)
DNA 5′
TTTTGGGGTTTTG—OH(3′)
3′
GCCAAAACCCCAAAACAAA
CUA
3′
5′
Polimerização e hibridização
(b)
5′
TTTTGGGGTTTTGGGGTTTTG—OH(3′)
3′
GCCAAAACCCCAAAACAAA
CUA
3′
5′
Translocação e reibridização
(c)
5′
TTTTGGGGTTTTGGGGTTTTG—OH(3′)
3′
GCCAAAACCCCAAAACAAA
CUA
3′
5′
Polimerização adicional
Proteínas de ligação ao DNA dúplex do telômero
Fita CA
Fita TG
5′
3′
TRF1 e TRF2
(d)
(e)

Figura 26-37 – A fita TG e a alça T dos telômeros. (**a**) O molde interno de RNA da telomerase se liga e faz um pareamento de bases com o iniciador TG do DNA (T_xG_y). (**b**) A telomerase adiciona mais resíduos de T e G ao TG iniciador, depois (**c**) repõe o molde interno de RNA para permitir a adição de mais resíduos de T e G. (**d**) Estrutura proposta das alças T nos telômeros. A cauda de fita simples sintetizada pela telomerase é dobrada de volta e parea com o seu complemento, na porção dúplex do telômero. (**e**) Eletromicrografia de uma alça T na extremidade de um cromossomo isolado de um hepatócito de camundongo. A barra, na parte de baixo da micrografia, representa um comprimento de 5.000 pares de bases.

gradualmente se encurtam à medida que o indivíduo envelhece. Se a transcriptase reversa da telomerase for introduzida nas células somáticas humanas *in vitro*, a atividade da telomerase é restaurada e a duração da vida celular aumenta consideravelmente. Será o encurtamento gradual do telômero uma chave para o processo de envelhecimento? Será a nossa duração de vida natural determinada pelo comprimento dos telômeros com os quais nascemos? Outras pesquisas nessa área poderiam revelar descobertas fascinantes.

Alguns RNAs virais são replicados pela RNA polimerase dependente de RNA

Alguns bacteriófagos da *E. coli,* incluindo f2, MS2, R17, e Qβ, possuem genomas de RNA. Os cromossomos de fita única de RNA desses vírus, que também funcionam como mRNAs para a síntese das proteínas virais, são replicados na célula hospedeira por uma **RNA polimerase dependente de RNA (RNA replicase)**. Essa enzima (M_r ~210.000) apresenta quatro subunidades. Uma subunidade (M_r 65.000), que possui o sítio ativo para a replicação, é o produto do gene da replicase, codificado pelo RNA viral. As outras três subunidades são proteínas hospedeiras, normalmente envolvidas na síntese de proteínas da célula hospedeira: os fatores de elongação Tu (M_r 30.000) e Ts (M_r 45.000) (que normalmente transportam aminoacil-tRNAs para os ribossomos) e a proteína S1 (normalmente parte integral da subunidade 30S dos ribossomos). Essas três proteínas do hospedeiro podem ajudar a RNA replicase a se localizar e ligar às extremidades 3′ dos RNAs virais.

A RNA replicase, isolada a partir das células da *E. coli* infectadas com o Qβ, catalisa a formação de um RNA complementar ao RNA viral, em uma reação semelhante àquela catalisada pelas RNA polimerases dependentes de DNA. A síntese da nova fita de RNA prossegue na direção 5′→3′, por um mecanismo químico idêntico àquele usado em todas as outras reações de síntese de ácidos nucléicos que requerem um molde. A RNA replicase requer RNA como molde e não funcionará com DNA. A enzima não possui uma atividade revisora e a freqüência de erro é semelhante àquela da RNA polimerase. Ao contrário das DNA e RNA polimerases, as RNA replicases são específicas para o RNA dos seus próprios vírus; os RNAs das células hospedeiras geralmente não são replicados. Isso explica como os vírus de RNA são replicados preferencialmente na célula hospedeira, que contém muitos outros tipos de RNA.

A síntese do RNA oferece importantes pistas para a evolução bioquímica

A extraordinária complexidade e a ordem que distinguem os sistemas vivos dos inanimados são manifestações-chave dos processos fundamentais da vida. A manutenção do estado de vida requer que transformações químicas *selecionadas* ocorram muito rapidamente — especialmente aquelas que usam as fontes de energia ambiental e que sintetizam as macromoléculas elaboradas e especializadas da célula. A vida depende de catalisadores poderosos e muito seletivos — as enzimas — e de sistemas de informação capazes tanto de armazenar um plano de segurança para essas enzimas quanto de reproduzi-las precisamente, geração após geração. Os cromossomos codificam o plano não para a célula, mas sim para as enzimas, que constroem e mantêm a célula. As demandas paralelas de informação e catálise apresentam um enigma clássico sobre o que chegou primeiro: a informação, necessária para especificar a estrutura, ou as enzimas, necessárias para manter e transmitir a informação?

A revelação da complexidade funcional e estrutural do RNA levou Carl Woese, Francis Crick e Leslie Orgel a proporem, na década de 1960, que essa macromolécula pudesse ter funções tanto de transportadores de informação quanto de catalisadores. A descoberta dos RNAs catalíticos levou essa proposta de conjectura à hipótese, e tem levado a uma grande especulação sobre a idéia de que um "mundo de RNA" poderia ter sido importante na transição da química pré-biótica para a vida. Os pais de toda a vida, no sentido de que ela pudesse se reproduzir a si própria através de gerações até o presente, poderia ter sido um RNA auto-replicante ou um polímero com características químicas equivalentes.

Carl Woese

Francis Crick

Leslie Orgel

Como poderia um polímero auto-replicante ter surgido? Como ele poderia se manter em um ambiente onde os precursores para a síntese do polímero são escassos? Como poderia a evolução progredir de tal polímero para o moderno mundo do DNA–proteína? Essas difíceis questões podem ser solucionadas por meio de estudos cuidadosos, que forneçam idéias sobre como a vida na Terra começou e se desenvolveu.

A origem provável das bases púricas e pirimídicas pode ser encontrada nos experimentos designados para testar as hipóteses sobre a química pré-biótica (veja pág. 57). Começando com moléculas simples, que se acreditavam estar presentes na atmosfera inicial (CH_4, NH_3, H_2O, H_2), descargas elétricas, como relâmpagos, geram primeiro moléculas mais reativas, tais como HCN e aldeídos, depois um conjunto de aminoácidos e ácidos orgânicos (veja Tabela 3-6). Quando moléculas como o HCN se tornam abundantes, as bases púricas e pirimídicas são sintetizadas em quantidades detectáveis. Extraordinariamente, uma solução concentrada de cianeto de amônio, refluxada por alguns dias, gera adenina em concentrações até 0,5% (Fig. 26-38). A adenina pode bem ter sido o primeiro e mais abundante nucleotídeo constituinte a aparecer na Terra. Intrigantemente, a maioria dos co-fatores das enzimas contém adenosina como parte de sua estrutura, embora ela não desempenhe um papel

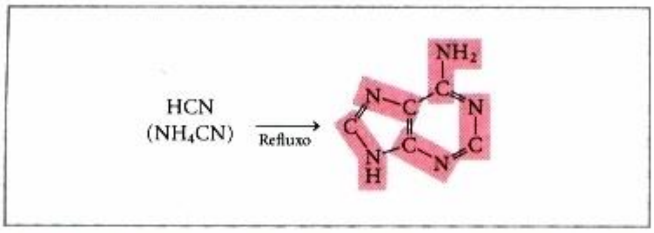

HCN
(NH_4CN)
Refluxo
NH_2
N
C
H

Figura 26-38 – Possíveis sínteses pré-bióticas da adenina a partir do cianeto de amônio. A adenina é derivada de cinco moléculas do cianeto, marcadas pelo sombreamento.

direto na função do co-fator (veja Fig. 10-41). Isso pode sugerir uma relação evolucionária, baseada na simples síntese da adenina a partir do cianeto.

A hipótese de "mundo do RNA" requer um polímero de nucleotídeo para se auto-reproduzir. Pode uma ribozima causar sua própria síntese de uma maneira direcionada pelo molde? O íntron autocortável da *Tetrahymena* (Fig. 26-28) catalisa o ataque reversível de um resíduo de guanosina na junção cortada 5′ (Fig. 26-39). Se o sítio cortado e a seqüência guia interna forem removidos do íntron, o resto do íntron pode ligar fitas de RNA pareadas com oligonucleotídeos curtos. Parte do íntron que permanece intacto age efetivamente como um molde para o alinhamento e a ligação do oligonucleotídeo curto. A reação é, na essência, uma inversão do ataque da guanosina à junção cortada 5′. Entretanto, o resultado é a síntese de longos polímeros de RNA a partir dos curtos, com a seqüência do produto definida por um molde de RNA.

Um polímero auto-replicativo usaria rapidamente os suprimentos disponíveis de precursores fornecidos pelos processos relativamente lentos da química pré-biótica. Dessa forma, a partir de uma etapa inicial na evolução, as vias metabólicas seriam requeridas para gerar precursores de maneira eficiente. As ribozimas encontradas na natureza possuem um repertório limitado de funções catalíticas, mas sabemos que o potencial catalítico do RNA é muito maior. A procura por RNAs com novas funções catalíticas se beneficiou com o desenvolvimento

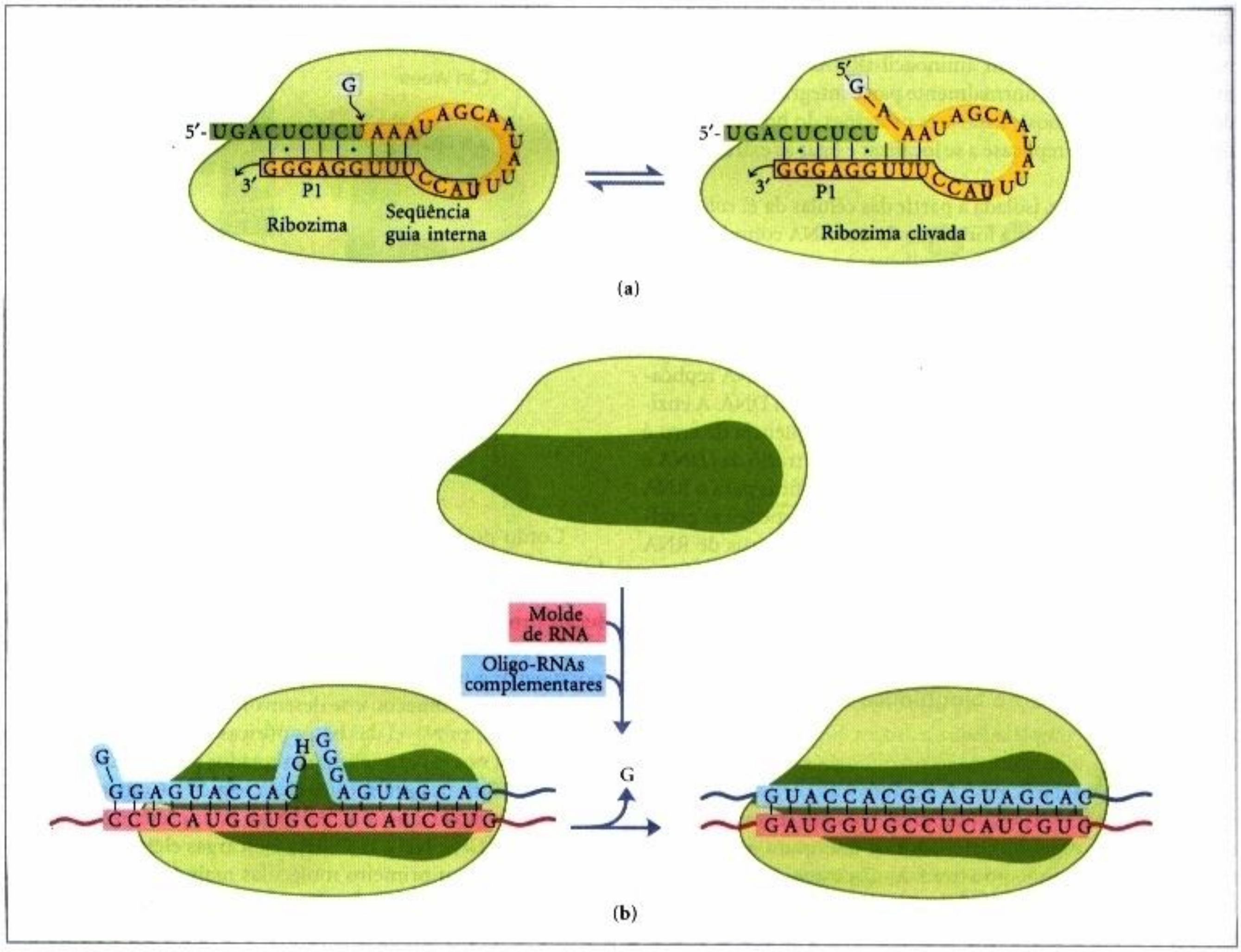

G
5′-UGACUCUCUAAAUAGCAAUAUU
3′ GGGAGGUUUCCAUUU
P1
Ribozima
Seqüência guia interna
5′ G
5′-UGACUCUCU AAUAGCAAUAUU
3′ GGGAGGUUUCCAUUU
P1
Ribozima clivada
(a)
Molde de RNA
Oligo-RNAs complementares
G
GGAGUACCAC
H O
G G G
AGUAGCAC
CCUCAUGGUGCCUCAUCGUG
G
GUACCACGGAGUAGCAC
GAUGGUGCCUCAUCGUG
(b)

Figura 26-39 – Síntese de um polímero de RNA, dependente de RNA a partir de precursores oligonucleotídeos. (**a**) A primeira etapa na remoção do íntron do grupo I por auto-emenda do precursor de rRNA da *Tetrahymena* é o ataque reversível de um resíduo de guanosina no sítio de corte 5′. Apenas P1, a região da ribozima que inclui a seqüência guia interna e o sítio de corte 5′, é mostrado em detalhe; o resto da ribozima é representado como uma mancha verde. A estrutura secundária completa da ribozima é mostrada na Figura 26-28. (**b**) Se P1 for removido, a ribozima retém tanto sua forma tridimensional quanto sua capacidade catalítica. Uma nova molécula de RNA adicionada *in vitro* pode se ligar à ribozima, da mesma maneira como o fez a seqüência guia interna de P1 em (**a**). Isso fornece um molde para as reações adicionais da polimerização do RNA, quando oligonucleotídeos complementares ao RNA adicionado parearem com ele. A ribozima pode ligar esses oligonucleotídeos em um processo equivalente à *inversão* da reação em (**a**). Embora apenas uma de tais reações seja mostrada em (**b**), ligações e catálise repetidas podem levar à síntese de polímeros longos de RNA dependentes de RNA.

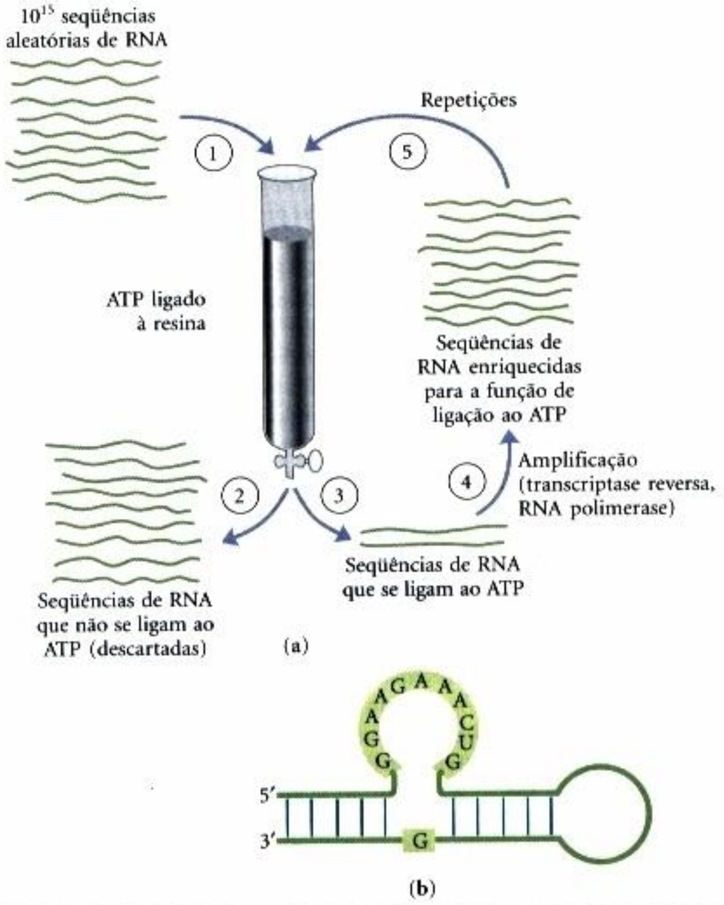

10^{15} seqüências aleatórias de RNA
Repetições
①
⑤
ATP ligado à resina
Seqüências de RNA enriquecidas para a função de ligação ao ATP
Amplificação (transcriptase reversa, RNA polimerase)
④
②
③
Seqüências de RNA que se ligam ao ATP
Seqüências de RNA que não se ligam ao ATP (descartadas)
(a)
G A A
A A
A C
G U
G G
5′
3′
G
(b)

Figura 26-40 – O método SELEX para gerar polímeros de RNA com novas funções. (**a**) Neste exemplo, o SELEX é usado para selecionar uma espécie de RNA que se liga fortemente ao ATP. ① Uma mistura aleatória de polímeros de RNA é submetida à "seleção não-natural" passando-a através de uma resina à qual o ATP está ligado. O limite prático para a complexidade de uma mistura de RNA em SELEX é cerca de 10^{15} seqüências diferentes, o que permite a completa combinação aleatória de 25 nucleotídeos ($4^{25} = 10^{15}$). Polímeros de RNA que passam através da coluna são descartados ②; aqueles que se ligam ao ATP são lavados da coluna com uma solução de sal e coletados ③. Os polímeros coletados são amplificados ④, freqüentemente usando a transcriptase reversa para fazer muitos complementos de DNA para os RNAs selecionados, depois uma RNA polimerase para fazer muitos complementos de RNA das moléculas de DNA resultantes. ⑤ Esse novo conjunto de RNAs é submetido ao mesmo processo de seleção, e o ciclo é repetido uma dúzia de vezes ou mais. No final, apenas algumas poucas seqüências de RNA, com afinidade considerável para o ATP, permanecem. (**b**) Estrutura de um oligonucleotídeo de RNA que se liga ao ATP. Os nucleotídeos requeridos para a atividade de ligação são mostrados. Moléculas com essa estrutura geral se ligam ao ATP com $K_d < 50\mu M$.

de um método que, de forma rápida, procura estoques de polímeros aleatórios de RNA e extrai aqueles com atividades especiais. SELEX ("*s*ystematic *e*volution of *l*igands by *ex*ponential enrichment", ou evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial) é nada menos do que a evolução acelerada em um tubo de ensaio (Fig. 26-40). A SELEX tem sido usada para gerar moléculas de RNA que se ligam a aminoácidos, corantes orgânicos, nucleotídeos, cianocobalamina e outras moléculas. Também têm sido isoladas ribozimas que catalisam a formação da ligação éster e de amida, reações de SN2, metalização (adição de íons metálicos) de porfirinas e formação da ligação carbono-carbono. A evolução de co-fatores enzimáticos com nucleotídeos que facilitam sua ligação às ribozimas pode ter expandido ainda mais o repertório de processos químicos disponível aos sistemas metabólicos primitivos.

Como veremos no próximo capítulo, algumas moléculas de RNA podem catalisar a formação de ligações peptídicas, oferecendo uma idéia de como o mundo do RNA pode ter se transformado para o maior potencial catalítico de proteínas. O papel do RNA de transportador de informação pode ter passado para o DNA, porque o DNA é quimicamente mais estável. A replicase e a transcriptase reversa do DNA podem ser as versões modernas das enzimas que algum dia desempenharam papéis importantes ao fazer a transição para o sistema moderno baseado no DNA.

Parasitas moleculares podem também ter se originado em um mundo de RNA. Com o aparecimento dos primeiros auto-replicadores ineficientes, a transposição poderia ter sido uma alternativa potencialmente importante para a replicação, bem como uma estratégia de sucesso para a reprodução e sobrevivência. RNAs primitivos poderiam simplesmente saltar para dentro de uma molécula auto-replicante por meio de uma transesterificação catalisada, e depois ser passivamente replicados. A seleção natural poderia ter levado a transposição a tornar-se sítio-específica, atingindo seqüências que não interferem com as atividades catalíticas do RNA hospedeiro. Replicadores e transposons de RNA poderiam ter existido em uma relação simbiótica primitiva, cada um contribuindo para a evolução do outro. Íntrons modernos, retrovírus e transposons podem todos ser vestígios de uma estratégia perseguida por primitivos RNAs parasitas. Esses elementos continuam contribuindo de forma importante para a evolução de seus hospedeiros.

Embora o mundo do RNA continue sendo uma hipótese com muitas lacunas a ser ainda preenchidas, a evidência experimental apóia alguns dos seus elementos-chave. Outros experimentos deverão contribuir para aumentar a nossa compreensão. Indícios importantes para o quebra-cabeça serão encontrados nos trabalhos da química fundamental, dentro de células vivas, e talvez em outros planetas.

Resumo

A transcrição é catalisada pela RNA polimerase dependente do DNA, uma enzima complexa que usa ribonucleosídeos 5′-trifosfatos para sintetizar RNA complementar à fita molde do DNA dúplex. A transcrição ocorre em várias fases, incluindo a ligação da RNA polimerase a um sítio do DNA chamado de promotor, a iniciação da síntese do transcrito, o alongamento e a terminação. A RNA polimerase bacteriana requer uma subunidade especial para reconhecer o promotor. Como primeira etapa na decisão de transcrição, a ligação da RNA polimerase ao promotor e a iniciação da transcrição são intimamente reguladas. As células eucarióticas possuem três tipos diferentes de RNA polimerases. A ligação da RNA polimerase II eucariótica aos seus promotores requer a atividade de um conjunto de proteínas chamadas de fatores de transcrição. A transcrição pára em seqüências específicas chamadas de terminadores.

Os RNAs ribossômicos e os RNAs de transferência são derivados de precursores de RNAs mais longos, que são aparados por nucleases. Algumas bases são também modificadas enzimaticamente durante o processo de amadurecimento. Os mRNAs eucarióticos são também formados a partir de precursores mais longos. Os transcritos primários de RNA freqüentemente contêm regiões não-codificadoras chamadas de íntrons, os quais são removidos por cortes. A excisão dos íntrons do grupo I encontrados em alguns rRNAs requer um co-fator de guanosina. Alguns íntrons dos grupos I e II são capazes de se autoemendarem; nenhuma enzima protéica é requerida. Os precursores nucleares do mRNA possuem uma terceira classe de íntrons, que são emendados com a ajuda de complexos RNA-proteínas, chamados de snRNPs, montados em estruturas elaboradas chamadas de emendossomos. RNAs mensageiros são também modificados pela adição de um resíduo de 7-metilguanosina na extremidade 5′, seguida pela clivagem e poliadenilação na extremidade 3′ para formar uma longa cauda poli(A). Uma quarta classe de íntrons, encontrada em alguns tRNAs, é a única classe conhecida que é emendada por enzimas protéicas.

Os íntrons autocortáveis e o componente RNA da RNase P (a enzima que cliva a extremidade 5′ dos precursores tRNA) pertencem a uma classe de catalisadores biológicos chamados de ribozimas. Estes possuem as propriedades de verdadeiras enzimas. Eles geralmente promovem a clivagem hidrolítica e a transesterificação, usando o RNA como substrato. Combinações dessas reações podem ser promovidas pelo íntron do grupo I excisado do rRNA da *Tetrahymena*, resultando em um tipo de reação de polimerização do RNA.

A polinucleotídeo fosforilase pode reversivelmente formar polímeros semelhantes de RNA a partir de ribonucleosídeos 5′-difosfato, adicionando ou removendo ribonucleotídeos na extremidade hidroxila 3′ do polímero. Ela degrada RNA *in vivo*.

As DNA polimerases dependentes de RNA, também chamadas de transcriptases reversas, são produzidas em células animais infectadas por vírus de RNA chamados de retrovírus. Essas enzimas transcrevem o RNA viral em DNA, um processo que pode ser usado experimentalmente para formar DNA complementar. Muitos transposons eucarióticos são relacionados aos retrovírus, e seu mecanismo de transposição inclui um intermediário de RNA. A telomerase, a enzima que sintetiza as extremidades dos telômeros de cromossomos lineares, é uma transcriptase reversa especializada, que contém um RNA molde interno.

As RNA polimerases dependentes de RNA, ou replicases, são encontradas nas células bacterianas infectadas com certos vírus de RNA. Elas são moldes específicos para o RNA viral.

A existência de RNAs catalíticos e de vias para a interconversão do RNA e DNA tem levado à especulação de que um estágio importante na evolução foi o aparecimento de um RNA (ou um polímero equivalente), que poderia catalisar sua própria replicação. O potencial bioquímico dos RNAs pode ser explorado por SELEX, um método para selecionar rapidamente seqüências de RNA, com ligações ou propriedades catalíticas específicas.

Leitura Adicional

Geral

Jacob F & Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356.

Um artigo clássico que introduz muitas idéias importantes.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, & Darnell J. (1999) *Molecular Cell Biology*, 4th edn, WH Freeman and Company, New York.

Síntese de RNA direcionada por DNA

Conaway RC & Conaway JW. (1997) General transcription factors for RNA polymerase II. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **56**, 327-346.

Um resumo especialmente bom do que se conhece sobre os fatores de alongamento.

Conaway JW & Conaway RC. (1999) Transcription elongation and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 301-320.

DeHaseth PL, Zupancic ML, & Record MT Jr. (1998) RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **180**, 3019-3025.

Estrem ST, Gaal T, Ross W, & Gourse RL. (1998) Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9761-9766.

Friedberg EC. (1996) Relationships between DNA repair and transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 15-42.

Gross CA, Chan CL, & Lonetto MA. (1996) A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **351**, 475-482.

Kornberg RD. (1996) RNA polymerase II transcription control. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 325-327.

Introduz um número do *Trends in Biochemical Sciences* dedicado à RNA polimerase II.

Mooney RA, Artsimovitch I, & Landick R. (1998) Informational processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. *J. Bacteriol.* **180**, 3265-3275.

Processamento do RNA

Beelman CA & Parker R. (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* **81**, 179-183.

Colgan DF & Manley JL. (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* **11**, 2755-2766.

Curcio MJ & Belfort M. (1996) Retrohoming: cDNA-mediated mobility of group II introns requires a catalytic RNA. *Cell* **84**, 9-12.

Frank DN & Pace NR. (1998) Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA-processing ribozyme. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 153-180.

Michel F & Ferat J-L. (1995) Structure and activities of group II introns. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 435-461.

Murray HL & Jarrel KA. (1999) Flipping the switch to an active spliceosome. *Cell* **96**, 599-602.

Narlikar GJ & Herschlag D. (1997) Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 19-59.

Sarkar N. (1997) Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 173-197.

Scott WG & Klug A. (1996) Ribozymes: structure and mechanism in RNA catalysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 220-224.

Spinelli SL, Kierzek R, Turner DH, & Phizicky EM. (1999) Transient ADP-ribosylation of a 2'-phosphate implicated in its removal from ligated tRNA during splicing in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 2637-2644.

Deseja saber onde o grupo fosforil foi na última etapa na Figura 26-17? Esse trabalho te contará.

Staley JP & Guthrie C. (1988) Mechanical devices of the spliceosome — motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**, 315-326.

Síntese de RNA ou DNA direcionados por RNA

Bishop JM. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**, 235-248.

Uma boa revisão dos oncogenes; introduz uma série de revisões mais detalhadas, incluídas no mesmo número de *Cell*.

Blackburn EH. (1992) Telomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 113-129.

Boeke JD & Devine SE. (1998) Yeast retrotransposons: finding a nice, quiet neighborhood. *Cell* **93**, 1087-1089.

Collins K. (1999) Ciliate telomerase biochemistry. *Annu Rev. Biochem.* **68**, 187-218.

Frankel AD & Young JAT. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1-25.

Greider CW. (1996) Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 337-365.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H & de Lange T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514.

Lingner J & Cech TR. (1998) Telomerase and chromosome end maintenance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 226-232.

Temin HM. (1976) The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis. *Science* **192**, 1075-1080.

Uma discussão da proposta original para a transcriptase reversa nos retrovírus.

Zakian VA. (1995) Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**, 1601-1607.

Ribozima e evolução

Gold L, Brown D, He Y-Y, Shtatland R, Singer BS, & Wu Y. (1997) From oligonucleotide shapes to genomic SELEX: novel biological regulatory loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 59-64.

Pace NR. (1991) Origin of life—facing up to the physical setting. *Cell* **65**, 531-533.

Wilson DS & Szostak JW. (1999) In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 611-648.

Problemas

1. RNA polimerase. (a) Quanto tempo levaria para a RNA polimerase da *E. coli* sintetizar o transcrito primário dos genes que codificam as enzimas do metabolismo da lactose na *E. coli* (os 5.300 pares de bases do operon *lac*, considerados no Capítulo 28)? (b) Quão longe iria uma bolha de transcrição de DNA formada pela movimentação da RNA polimerase em 10s?

2. Correção de erro pelas RNA polimerases. As DNA polimerases são capazes de editar e corrigir erros, mas as RNA polimerases não parecem ter essa capacidade. Considerando que um único erro de base, quer na replicação quer na transcrição, possa levar a um erro na síntese de proteínas, sugira uma possível explicação biológica para essa diferença impressionante.

3. Processamento pós-transcricional do RNA. Preveja os prováveis efeitos de uma mutação na seqüência (5')AAUAAA em um transcrito de mRNA eucariótico.

4. Fitas codificadoras *versus* moldes. O genoma de RNA do fago Qβ é a fita não-molde ou fita codificadora, e, quando introduzida na célula, ela funciona como um mRNA. Suponha que a RNA replicase do fago Qβ sintetizasse primeiramente a fita RNA molde e só a incorporasse nas partículas virais, e não nas fitas não-moldes. Qual seria o destino das fitas moldes quando elas entrassem em uma nova célula? Que enzima a fita molde do vírus necessitaria incluir nas partículas virais para invadir com sucesso uma célula hospedeira?

5. A química da biossíntese dos ácidos nucléicos. Descreva três propriedades comuns às reações catalisadas por DNA polimerase, RNA polimerase, transcriptase reversa e RNA replicase. No que a enzima polinucleotídeo fosforilase é semelhante e no que ela difere dessas três enzimas?

6. Emenda do RNA. Qual é o número mínimo de reações de transesterificação necessários para cortar e emendar um íntron a partir de um transcrito de mRNA? Por quê?

7. Genomas de RNA. Os vírus de RNA possuem genomas relativamente pequenos. Por exemplo, os RNAs fitas simples dos retrovírus possuem cerca de 10.000 nucleotídeos e o RNA Qβ tem apenas 4.220 nucleotídeos de comprimento. Considerando as propriedades da transcriptase reversa e da RNA replicase descritas neste capítulo, você poderia sugerir uma razão para o tamanho pequeno desses genomas virais?

8. Selecionando RNAs por SELEX. O limite prático do número de seqüências de RNA diferentes que pode ser selecionado em um experimento SELEX é 10^{15}. (a) Suponha que você esteja trabalhando com oligonucleotídeos de 32 nucleotídeos de tamanho. Quantas seqüências existem em um estoque aleatório que contém todas as seqüências possíveis? (b) Que porcentagem delas pode ser selecionada em um experimento SELEX? (c) Suponha que você deseja selecionar uma molécula de RNA que catalise a hidrólise de um éster específico. Do que você sabe sobre catálise (Capítulo 8), proponha uma estratégia SELEX que possa permitir que você selecione o catalisador apropriado.

9. Morte lenta. O cogumelo da morte, *Amanita phalloides*, contém várias substâncias perigosas, incluindo a letal α-amanitina. Essa toxina bloqueia o alongamento do RNA em consumidores do cogumelo, pela sua ligação com grande afinidade à RNA polimerase II eucariótica; ela é mortal em concentrações baixas como 10^{-8}M. A reação inicial à ingestão do cogumelo é um desconforto gastrointestinal (causado por outras toxinas). Esses sintomas desaparecem, mas cerca de 48 horas mais tarde, o indivíduo que ingeriu o cogumelo morre, geralmente por disfunção do fígado. Especule sobre por que leva tanto tempo para a α-amanitina matar.

10. Detecção de uma cepa da TB resistente à rifampicina. A rifampicina é um importante antibiótico, usado tanto para tratar a tuberculose (TB) como outras doenças micobacterianas. Algumas cepas do *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da TB, são resistentes à rifampicina. Essas cepas se tornam resistentes por meio de mutações que alteram o gene *rpo*B, o qual codifica a subunidade β da RNA polimerase. A rifampicina não consegue se ligar à mutante da RNA polimerase e, dessa forma, é incapaz de bloquear a iniciação da transcrição. Seqüências de DNA de um grande número de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina apresentaram mutações em uma região específica da *rpo*B de 69 pares de bases. Uma cepa bem caracterizada com resistência à rifampicina apresenta uma única alteração em um par de base na *rpo*B, que leva à substituição de um único aminoácido na subunidade β: um resíduo de His é substituído por um resíduo de Asp.

(a) Baseando-se em seu conhecimento sobre a química das proteínas (Capítulos 5 e 6), sugira uma técnica que permita a identificação da cepa resistente à rifampicina que contém essa proteína mutante específica.

(b) Baseando-se no seu conhecimento sobre a química dos ácidos nucléicos (Capítulo 10), sugira uma técnica para identificar a forma mutante da *rpo*B.

Bioquímica na internet

11. O gene da ribonuclease. A ribonuclease pancreática humana possui 128 resíduos de aminoácidos.

(a) Qual é o número mínimo de pares de nucleotídeos requerido para codificar essa proteína?

(b) O mRNA expresso nas células do pâncreas humano foi copiado com a transcriptase reversa para criar uma "biblioteca" do DNA humano. A seqüência de mRNA que codifica a ribonuclease pancreática humana foi determinada seqüenciando o "DNA complementar" ou cDNA desta biblioteca que inclui uma janela de leitura aberta para a proteína. Use o sistema de dados do Entrez para encontrar a seqüência publicada desse mRNA (número de acesso D26129). Veja o site da Web *Principles of Biochemistry* para o URL atual e mais instruções detalhadas. Qual é o tamanho desse mRNA?

(c) Como você explicaria a discrepância entre o tamanho que você calculou em (a) e o tamanho real do mRNA?

CAPÍTULO 27

Metabolismo das Proteínas

As proteínas são os produtos finais da maioria das vias de informação. Uma célula típica requer milhares de diferentes proteínas em um certo momento. Estas devem ser sintetizadas em resposta às necessidades correntes da célula, transportadas (endereçadas) a localizações celulares apropriadas e degradadas quando a necessidade cessar.

Entender a síntese das proteínas, o mais complexo dos processos biossintetizantes, tem sido um dos maiores desafios da bioquímica. A síntese das proteínas eucarióticas envolve cerca de 70 proteínas ribossômicas diferentes; 20 ou mais enzimas para ativar os aminoácidos precursores; uma dúzia, ou mais, de enzimas auxiliares e outros fatores protéicos para a iniciação, alongamento e terminação dos polipeptídeos; talvez 100 enzimas adicionais para o processamento final das diferentes espécies de proteínas; e 40 ou mais espécies de RNAs de transferência e ribossômicos. No seu conjunto, quase 300 macromoléculas diferentes cooperam para sintetizar os polipeptídeos. Muitas dessas macromoléculas estão organizadas na estrutura tridimensional complexa do próprio ribossomo.

Para apreciar a importância central da síntese das proteínas, considere os recursos celulares que são dedicados a esse processo. A síntese de proteínas pode ser responsável por até 90% da energia química usada por uma célula para todas as reações biossintetizantes. Cada célula procariótica e eucariótica contém milhares de cópias de cada uma de suas proteínas e cada um de seus RNAs. Os 20.000 ribossomos, as 100.000 enzimas e fatores protéicos relacionados e os 200.000 tRNAs presentes em uma célula bacteriana típica podem perfazer cerca de mais de 35% do peso seco da célula.

A despeito dessa grande complexidade, as proteínas são sintetizadas em velocidades extremamente altas. Um polipeptídeo de 100 resíduos é sintetizado em uma célula da *E. coli* (a 37°C) em cerca de 5 segundos. A síntese de milhares de proteínas diferentes em cada célula é altamente regulada, de forma tal que apenas o número de moléculas requeridas é sintetizado para se adaptar às circunstâncias metabólicas da célula. Para manter a mistura e a concentração apropriadas das proteínas em uma célula, os processos de endereçamento e degradação devem manter passo com a síntese. A pesquisa está revelando, gradualmente, a coreografia celular altamente coordenada, que guia cada proteína à sua localização apropriada na célula e a degrada seletivamente quando não for mais necessária.

A síntese protéica é uma ação elaborada de fatores protéicos e moléculas de RNA e, em alguns casos, de proteínas que se parecem com RNAs. São mostradas duas proteínas que se ligam aos ribossomos em etapas específicas na síntese de proteínas. O fator de alongamento EF-Tu, complexado com o tRNA (verde), é mostrado na imagem superior. Um outro fator de alongamento, EF-G, complexado com GDP (vermelho), é mostrado na imagem inferior. Interessantemente, a parte carboxiterminal do EF-G (verde) mimetiza a estrutura do tRNA tanto na forma como na distribuição de carga. A mimetização estrutural do tRNA é apenas uma faceta da função das máquinas moleculares que sintetizam polipeptídeos em todas as células.

O Código Genético

Três avanços principais estabeleceram o estágio atual do nosso conhecimento sobre a biossíntese de proteínas. No início dos anos 1950, Paul Zamecnik e seus colaboradores delinearam um conjunto de experimentos para investigar onde são sintetizadas as proteínas na célula. Eles injetaram aminoácidos radioativos em ratos e, em intervalos de tempo diferentes após a injeção, o fígado era removido, homogeneizado e fracionado por centrifugação. As frações subcelulares eram, então, examinadas pela presença de proteína radioativa. Após horas ou dias da injeção dos aminoácidos marcados, *todas* as frações subcelulares continham proteínas marcadas. Entretanto, quando se passavam apenas alguns minutos, a proteína marcada era encontrada apenas em uma fração que continha pequenas partículas ribonucleoprotéicas. Essas partículas, visíveis nos tecidos animais à eletromicroscopia, foram, portanto, identificadas como o sítio da síntese de proteínas a partir dos aminoácidos, e, mais tarde, foram chamadas de ribossomos (Fig. 27-1).

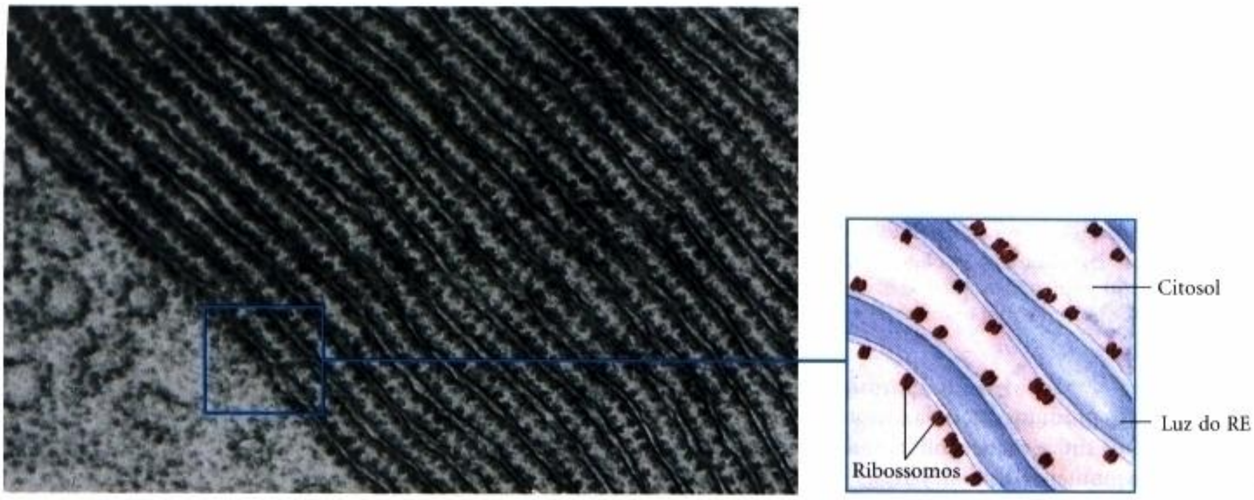


Figura 27-1 – Ribossomos e retículo endoplasmático. A eletromicrografia e o desenho esquematizado de parte de uma célula pancreática mostram ribossomos ligados à face externa (citosólica) do retículo endoplasmático (RE). Os ribossomos são os numerosos pontos pequenos que bordejam as camadas paralelas das membranas.

Paul Zamecnik

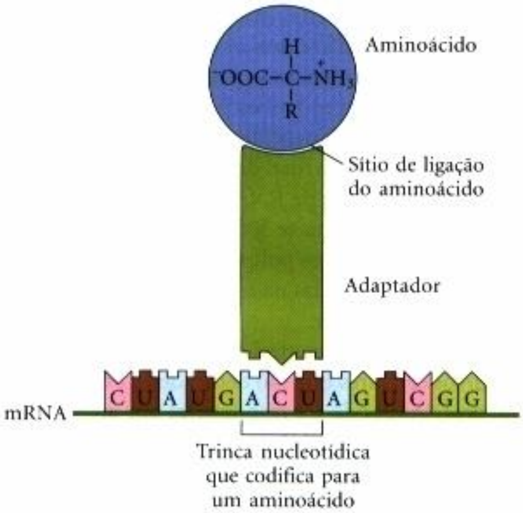

H
⁻OOC–C–NH₃⁺
R
Aminoácido
Sítio de ligação do aminoácido
Adaptador
mRNA
C U A U G A C U A G U C G G
Trinca nucleotídica que codifica para um aminoácido

Figura 27-2 – A hipótese do adaptador de Crick. Hoje, sabemos que o aminoácido está covalentemente ligado à extremidade 3' de uma molécula de tRNA e que uma trinca nucleotídica específica, em algum outro lugar do tRNA, interage com uma trinca códon específica no mRNA, por meio de pontes de hidrogênio de bases complementares.

O segundo avanço foi realizado por Mahlon Hoagland e Zamecnik quando descobriram que os aminoácidos eram "ativados" quando incubados com ATP e a fração citosólica das células do fígado. Os aminoácidos tornavam-se ligados a um RNA termoestável solúvel, chamado depois de RNA de transferência (tRNA), formando os **aminoacil-tRNAs**. As enzimas que catalisam esse processo são as **aminoacil-tRNA sintetases**.

O terceiro grande avanço ocorreu quando Francis Crick levou em consideração o fato de como a informação genética, que é codificada na linguagem de quatro letras dos ácidos nucléicos, poderia ser traduzida na linguagem de 20 letras das proteínas. Crick concluiu que um ácido ribonucléico pequeno (talvez RNA) poderia funcionar como um adaptador, uma parte da molécula do adaptador ligando-se a um aminoácido específico e uma outra parte reconhecendo a seqüência nucleotídica que codificava aquele aminoácido no mRNA (Fig. 27-2). Essa idéia foi logo verificada. O tRNA adaptador "traduz" a seqüência nucleotídica de um mRNA em uma seqüência de aminoácido de um polipeptídeo. O processo total da síntese de proteína guiada pelo mRNA é, com freqüência, citado simplesmente como **tradução**.

Esses três desenvolvimentos logo levaram ao reconhecimento das principais etapas da síntese de proteínas e, finalmente, à elucidação do código genético que especifica cada aminoácido.

O código genético foi decifrado usando moldes de mRNA artificiais

Desde os anos 1960, era aparente que, pelo menos, três resíduos nucleotídicos de DNA eram requeridos para codificar cada aminoácido. As quatro letras-código do DNA (A, T, G e C), em grupos de duas, podiam produzir apenas $4^2 = 16$ combinações diferentes, insuficientes para codificar os 20 aminoácidos. Grupos de três, entretanto, produziam $4^3 = 64$ combinações diferentes.

Várias propriedades-chave do código genético foram estabelecidas em experimentos genéticos iniciais (Figs. 27-3 e 27-4). Um **códon** é uma trinca de nucleotídeos que codifica para um aminoácido específico. A tradução ocorre de tal forma, que essas trincas nucleotídicas são lidas de maneira sucessiva, não-sobreposta. Um primeiro códon específico na seqüência estabelece uma **janela de leitura**, na qual começa um novo códon a cada três resíduos de nucleotídeos. Não há pontuação entre os códons para os sucessivos resíduos de aminoácidos. A seqüência de aminoácidos de uma proteína é definida por uma seqüência linear de trincas códons contíguas. Em princípio, qualquer seqüência de DNA de fita simples ou de mRNA possui três janelas de leitura possíveis. Cada janela de leitura oferece uma seqüência diferente de códons (Fig. 27-5), mas apenas uma codifica uma dada proteína. Uma questão-chave permanecia. Quais eram as palavras-chave de três letras para cada aminoácido?

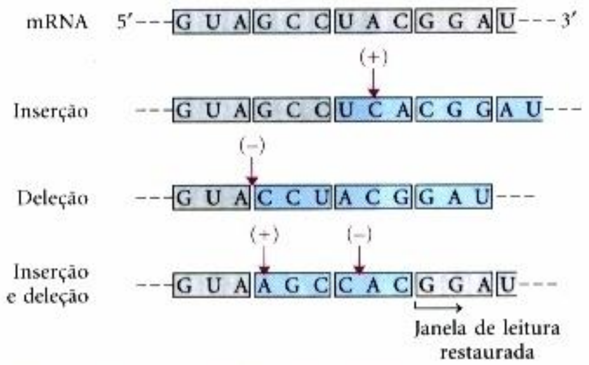

mRNA
5'---G U A G C C U A C G G A U---3'
(+)
Inserção
---G U A G C C U C A C G G A U---
(−)
Deleção
---G U A C C U A C G G A U---
(+)
(−)
Inserção e deleção
---G U A A G C C A C G G A U---
Janela de leitura restaurada

Figura 27-3 – A trinca, código não-sobreposto. A evidência para a natureza geral do código genético veio de muitos tipos de experimentos, incluindo experimentos genéticos sobre os efeitos das mutações de deleção e inserção. A inserção ou a deleção de um par de bases (mostradas aqui no mRNA transcrito) alteram a seqüência das trincas em um código não-sobreposto: todos os aminoácidos codificados pelo mRNA após a alteração são afetados. A combinação das mutações de inserção e deleção afeta alguns aminoácidos, mas pode, eventualmente, restaurar a seqüência correta de aminoácidos. A adição ou a subtração de três nucleotídeos (não mostradas) deixa as trincas remanescentes intactas, fornecendo evidência de que um códon possui três, em vez de quatro ou cinco nucleotídeos. As trincas códons, sombreadas em cinza, são aquelas transcritas a partir do gene original; códons, sombreados em azul, são códons novos, resultantes das mutações de inserção e deleção.

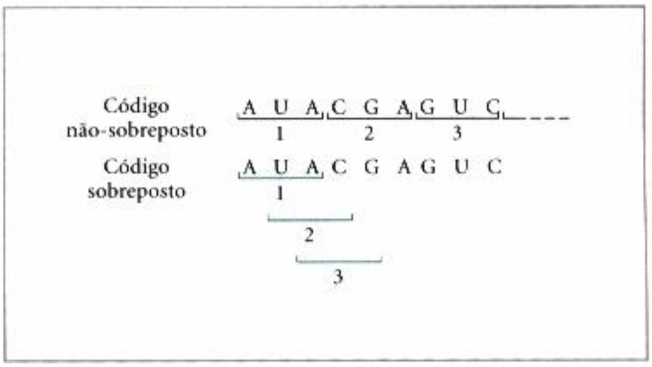


Figura 27-4 – Códigos genéticos sobrepostos e não-sobrepostos. Em um código não-sobreposto, os códons não partilham nucleotídeos. No exemplo mostrado, os códons consecutivos estão enumerados. Em um código sobreposto, alguns nucleotídeos do mRNA são compartilhados por diferentes códons. Em um código de trincas com o máximo de sobreposição, muitos nucleotídeos, como o terceiro nucleotídeo a partir da esquerda (A), são compartilhados por três códons diferentes. Observe que, em um código sobreposto, a seqüência do primeiro códon limita as possíveis seqüências para o segundo códon. Um código não-sobreposto fornece muito mais flexibilidade na seqüência dos códons vizinhos e, portanto, nas possíveis seqüências de aminoácidos designadas pelo código. O código genético usado em todos os sistemas vivos é hoje conhecido como não-sobreposto.

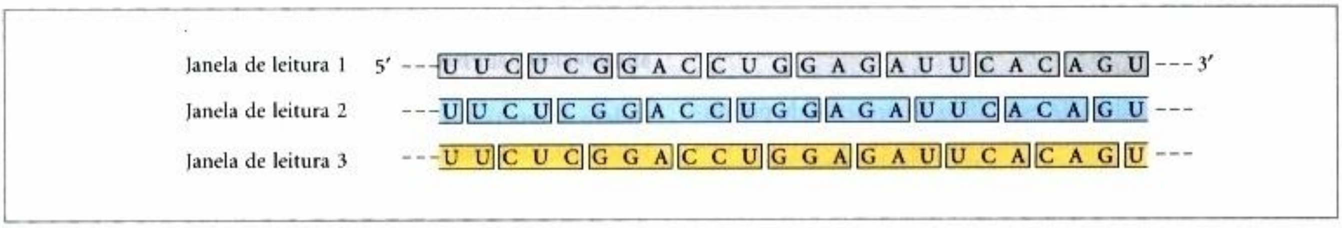

Janela de leitura 1
5' ---U U C U C G G A C C U G G A G A U U C A C A G U---3'
Janela de leitura 2
---U U C U C G G A C C U G G A G A U U C A C A G U---
Janela de leitura 3
---U U C U C G G A C C U G G A G A U U C A C A G U---

Figura 27-5 – Em uma trinca de código não-sobreposto, todos os mRNAs possuem três janelas de leitura potenciais, sombreadas aqui em cores diferentes. Observe que as trincas, e, portanto, os aminoácidos especificados, são diferentes em cada janela de leitura.

Em 1961, Marshall Nirenberg e Heinrich Matthaei relataram a primeira grande realização. Eles incubaram o polinucleotídeo poliuridilato sintético (designado poli(U)) com um extrato de *E. coli*, GTP, ATP e uma mistura de 20 aminoácidos em 20 tubos diferentes, cada tubo contendo um aminoácido diferente, marcado radioativamente. Pelo fato de o mRNA de poli(U) ser feito de muitas trincas UUU sucessivas, ele deveria promover a síntese de um polipeptídeo que contivesse apenas o aminoácido codificado pela trinca UUU. Um polipeptídeo radioativo foi, na verdade, formado em apenas um dos 20 tubos, aquele que continha a fenilalanina radioativa. Nirenberg e Matthaei, portanto, concluíram que a trinca códon UUU codificava a fenilalanina. A mesma abordagem revelou que o polinucleotídeo policitidilato sintético, ou poli(C), codificava a formação de um polipeptídeo que contém apenas prolina (poliprolina), e o poliadenilato, ou poli(A), codificava a polilisina. Poliguanilato não funcionou nesse experimento porque ele, espontaneamente, forma tetraplex (veja Fig. 10-22) que não conseguem se ligar aos ribossomos.

Marshall Nirenberg

Os polinucleotídeos sintéticos, usados em tais experimentos, foram sintetizados pela ação da polinucleotídeo fosforilase (pág. 791), que catalisa a formação dos polímeros de RNA que começam a partir de ADP, UDP, CDP e GDP. Essa enzima não requer molde e sintetiza polímeros com uma composição de base que reflete as concentrações relativas dos nucleosídeos 5'-difosfatos precursores no meio. Se a polinucleotídeo fosforilase for colocada somente com UDP, ela sintetiza apenas poli(U). Se for colocada com uma mistura de cinco partes de ADP e uma de CDP, ela sintetizará um polímero no qual cerca de $^5/_6$ dos resíduos serão adenilato e $^1/_6$ citidilato. Tal polímero aleatório provavelmente terá muitas trincas de seqüência AAA, um número menor de trincas AAC, ACA e CAA, relativamente poucas trincas ACC, CCA e CAC e muito poucas trincas CCC (Tabela 27-1). Usando uma variedade de mRNAs artificiais, sintetizados pela polinucleotídeo fosforilase a partir de diferentes misturas iniciais de ADP, GDP, UDP e CDP, os investigadores logo identificaram as composições de bases das trincas que codificavam para a maioria dos aminoácidos. Embora esses experimentos revelassem a composição de bases das trincas códigos, eles não revelavam a seqüência das bases.

Tabela 27-1 – Incorporação de aminoácidos em polipeptídeos em resposta a polímeros aleatórios de RNA*

Aminoácido	Freqüência observada de incorporação (Lys = 100)	Tentativa de alinhamento para a composição[†] nucleotídica do códon correspondente	Freqüência de incorporação esperada, baseada no alinhamento (Lys = 100)
Asparagina	24	A_2C	20
Glutamina	24	A_2C	20
Histidina	6	AC_2	4
Lisina	100	AAA	100
Prolina	7	AC_2, CCC	4,8
Treonina	26	A_2C, AC_2	24

*Aqui é apresentado um resumo dos dados de um dos experimentos iniciais, designados a elucidar o código genético. Um RNA sintético, que contém apenas resíduos A e C na proporção de 5:1, foi usado para direcionar a síntese polipeptídica. Tanto a identidade quanto a quantidade de aminoácidos incorporados foram determinadas. Baseando-se na abundância relativa dos resíduos A e C no RNA sintético e na freqüência de 100 atribuída ao códon AAA (o mais provável), deveria haver três códons diferentes de composição A_2C, cada um com uma freqüência relativa de 20, três códons de composição AC_2, cada um com uma freqüência relativa de 4,0, e o códon CCC, com uma freqüência relativa de 0,8. O alinhamento do CCC, aqui, baseava-se em informação derivada de estudos anteriores com poli(C). Em que duas tentativas de alinhamento de códons foram feitas, ambas foram propostas para codificar o mesmo aminoácido.

[†] Observe que essas designações de composição nucleotídica não contêm informação sobre a seqüência nucleotídica (exceto, é claro, AAA e CCC).

Em 1964, Nirenberg e Philip Leder conseguiram uma outra grande realização. Ribossomos isolados da *E. coli* poderiam ligar-se a um aminoacil-tRNA específico, na presença do polinucleotídeo mensageiro sintético correspondente. (Por convenção, a identidade de um tRNA é indicada por um sobrescrito, e um tRNA aminoacilado é indicado por um nome com hífen: um tRNA^{Ala} corretamente aminoacilado é o alanil-tRNA^{Ala} ou ala-tRNA^{Ala}.) Por exemplo, os ribossomos incubados com poli(U) e fenilalanina-tRNA^{Phe} (Phe-tRNA^{Phe}) ligar-se-ão a ambos os polímeros, mas se os ribossomos forem incubados com poli(U) e algum outro aminoacil-tRNA, o aminoacil-tRNA não se ligará, porque ele não reconhecerá as trincas UUU no poli(U) (Tabela 27-2). Mesmo trinucleotídeos promovem a ligação específica dos tRNAs apropriados, permitindo o uso de oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. Os pesquisadores puderam determinar, então, qual aminoacil-tRNA ligava-se a cerca de 50 das 64 trincas códons possíveis. Para alguns códons, ou nenhum aminoacil-tRNA ou mais do que um se ligavam. Um outro método foi necessário para completar e confirmar o código genético inteiro.

Por essa época, uma abordagem complementar foi fornecida por H. Gobind Khorana, que desenvolveu métodos para sintetizar polirribonucleotídeos, com seqüências definidas, repetidas de duas a quatro bases. Os polipeptídeos produzidos, usando esses RNAs como mensageiros, tinham um ou poucos aminoácidos em padrões repetidos. Estes padrões, quando combinados com a informação de polímeros aleatórios usados por Nirenberg e seus colaboradores, permitiram atribuições não mais ambíguas aos códons. O copolímero $(AC)_m$, por exemplo, possui códons alternantes ACA e CAC: ACACACACACACACA. O polipeptídeo sintetizado com esse mensageiro continha quantidades iguais de treonina e histidina. Considerando que um códon de histidina possui um A e dois C (Tabela 27-1), CAC deve codificar para histidina, e ACA, para treonina.

Um RNA com três bases em um padrão repetitivo deve produzir três tipos diferentes de polipeptídeo, cada um derivado de uma janela de leitura diferente e contendo uma única espécie de aminoácido. Um RNA com quatro bases em um padrão de repetição deve produzir um único tipo de polipeptídeo, com um padrão de repetição de quatro aminoácidos (Tabela 27-3). A consolidação dos resultados de todos esses experimentos com polímeros permitiu o alinhamento de 61 dos 64 códons possíveis. Os outros três foram identificados como códons de terminação, em parte porque eles interrompiam os padrões de codificação dos aminoácidos, quando incluídos na seqüência de um polímero de RNA sintético (Fig. 27-6 e Tabela 27-3).

Tabela 27-2 – Trinucleotídeos induzem a ligação específica dos aminoacil-tRNAs aos ribossomos

Trinucleotídeo	^{14}C-Aminoacil-tRNA ligado ao ribossomo*		
	Phe-tRNA^{Phe}	Lys-tRNA^{Lys}	Pro-tRNA^{Pro}
UUU	4,6	0	0
AAA	0	7,7	0
CCC	0	0	3,1

Fonte: Modificado de Nirenberg M & Leder P. (1964) RNA code words and protein synthesis. *Science* **145**, 1399.

*Cada número representa o fator pelo qual a quantidade de ^{14}C ligada ao ribossomo aumentava quando o trinucleotídeo indicado estivesse presente, em relação ao controle no qual o trinucleotídeo não fosse adicionado.

H. Gobind Khorana

Tabela 27-3 – Polipeptídeos produzidos em resposta aos polímeros sintéticos de RNA, com seqüências repetitivas de três e quatro bases

Polinucleotídeo	Produtos polipeptídicos
Repetições de trinucleotídeos	
$(UUC)_n$	$(Phe)_n$, $(Ser)_n$, $(Leu)_n$
$(AAG)_n$	$(Lys)_n$, $(Arg)_n$, $(Glu)_n$
$(UUG)_n$	$(Leu)_n$, $(Cys)_n$, $(Val)_n$
$(CCA)_n$	$(Pro)_n$, $(His)_n$, $(Thr)_n$
$(GUA)_n$	$(Val)_n$, $(Ser)_n$, (terminador de cadeia)*
$(UAC)_n$	$(Tyr)_n$, $(Thr)_n$, $(Leu)_n$
$(AUC)_n$	$(Ile)_n$, $(Ser)_n$, $(His)_n$
$(GAU)_n$	$(Asp)_n$, $(Met)_n$, (terminador de cadeia)*
Repetições de tetranucleotídeos	
$(UAUC)_n$	$(Tyr–Leu–Ser–Ile)_n$
$(UUAC)_n$	$(Leu–Leu–Thr–Tyr)_n$
$(GUAA)_n$	Di e tripeptídeos*
$(AUAG)_n$	Di e tripeptídeos*

*Com esses polinucleotídeos, os padrões de incorporação dos aminoácidos em polipeptídeos são afetados pela presença de códons, que são sinais de terminação para a biossíntese de proteínas. Nas seqüências com três bases repetidas, uma das três fases de leitura inclui apenas códons de terminação e, portanto, apenas dois homopolipeptídeos são observados (gerados a partir das duas fases de leitura remanescentes). Em algumas das seqüências com quatro bases repetidas, todo quarto códon é um códon de terminação em qualquer fase de leitura, de forma que apenas peptídeos curtos são produzidos. Isso está ilustrado na Figura 27-6 para o $(GUAA)_n$.

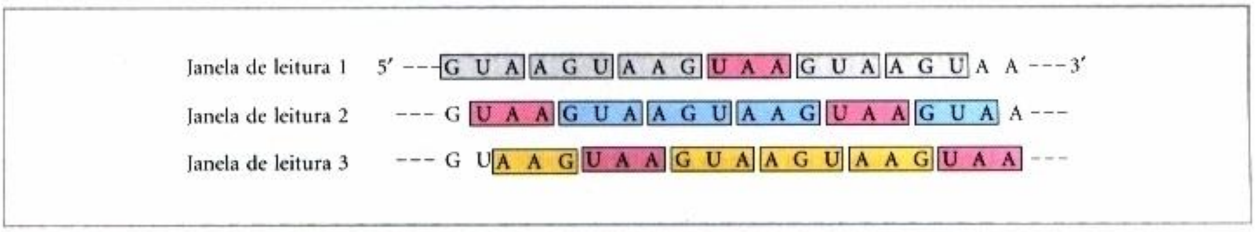

Janela de leitura 1
5' ---G U A A G U A A G U A A G U A A G U A A ---3'
Janela de leitura 2
--- G U A A G U A A G U A A G U A A G U A A ---
Janela de leitura 3
--- G U A A G U A A G U A A G U A A G U A A ---

Figura 27-6 – Efeito de um códon de terminação em um tetranucleotídeo repetitivo. Dipeptídeos ou tripeptídeos são sintetizados, dependendo de onde o ribossomo inicialmente se ligar. As três janelas de leitura diferentes são mostradas em cores diferentes. Códons de terminação (indicados em vermelho) são encontrados a cada quarto códon, em todas as janelas de leitura.

Os significados para todas as trincas códons (Fig. 27-7) foram estabelecidos em 1966 e têm se mostrado verdadeiros de muitas maneiras diferentes. A decifração do código genético é lembrada como uma das mais importantes descobertas científicas do século XX.

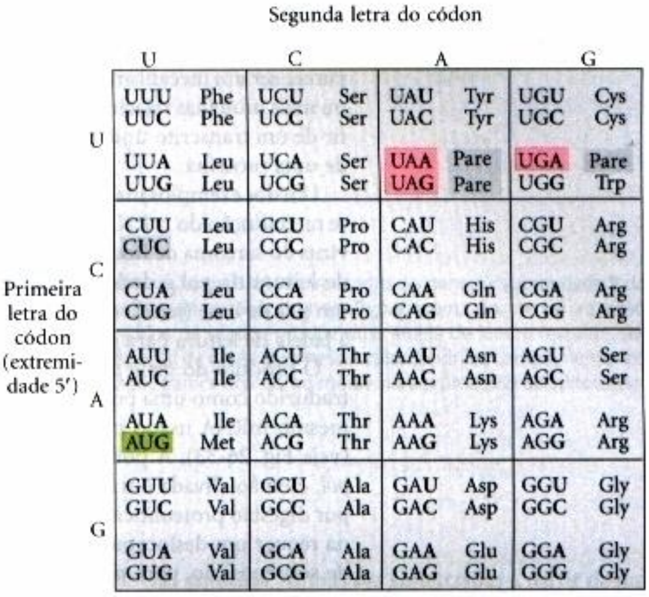
Os códons são a chave para a tradução da informação genética, permitindo a síntese de proteínas específicas. A janela de leitura é estabelecida quando a tradução de uma molécula de um mRNA começa e é mantida, à medida que a maquinaria sintetizante lê seqüencialmente de uma trinca para a outra. Se a janela de leitura inicial for desligada por uma ou duas bases, ou se os ribossomos acidentalmente pularem um nucleotídeo no mRNA, todos os códigos subseqüentes ficarão fora de registro; isso levará a uma proteína "sem sentido", com uma seqüência de aminoácidos deturpada (Adendo 27-1).

Vários códons desempenham funções especiais. O **códon de iniciação**, AUG, sinaliza o início das cadeias polipeptídicas em todas as células, além de codificar resíduos de Met nas posições internas dos polipeptídeos. Como observado anteriormente, três das 64 possíveis trincas nucleotídicas (UAA, UAG e UGA; Fig. 27-7) não codificam nenhum aminoácido conhecido. Esses **códons de terminação** (também chamados de códons de parada ou códons sem sentido) normalmente sinalizam o fim da síntese polipeptídica.

Como descrito posteriormente neste capítulo, a iniciação da síntese de proteínas na célula é um processo elaborado que depende dos códons de iniciação e de outros sinais no mRNA. Em retrospecto, os experimentos de Nirenberg e Khorana para identificar a função códon não deveriam ter funcionado na ausência de códons de iniciação. Fortuitamente, as condições experimentais usadas forçaram que os requerimentos para a iniciação normal da síntese de proteínas fossem relaxados. Diligência combinada com a chance produziram uma realização — uma ocorrência comum na história da bioquímica.

Em uma seqüência aleatória de nucleotídeos, um em cada 20 códons em cada janela de leitura, em média, será um códon de terminação. Em geral, uma janela de leitura sem um códon de terminação entre 50 ou mais códons é chamada de uma **janela de leitura aberta**. Janelas de leituras abertas longas usualmente correspondem a genes que codificam proteínas. Um gene não interrompido que codifica para uma proteína típica com um peso molecular de 60.000 requereria uma janela de leitura aberta com 500 ou mais códons.

Uma característica que se destaca no código genético é que um aminoácido pode ser especificado por mais de um códon, de forma que ele é descrito como **degenerado**. Isso *não* sugere que o código seja defeituoso: cada códon especifica apenas um aminoácido. A degeneração do código não é uniforme. Enquanto a metionina e o triptofano possuem códons únicos, três aminoácidos (Leu, Ser, Arg), por exemplo, possuem seis códons, cinco aminoácidos possuem quatro, Ile possui três, e nove aminoácidos possuem dois (Tabela 27-4).



Primeira letra do códon (extremidade 5')	Segunda letra do códon: U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Pare	UGA	Pare
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Pare	UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

Figura 27-7 – "Dicionário" das palavras-código dos aminoácidos, como ocorrem nos mRNAs. Os códons são escritos na direção 5'→3'. A terceira base de cada códon (em negrito) desempenha um papel menor na especificação de um aminoácido do que as duas primeiras. Os três códons de terminação são mostrados em vermelho e o códon de iniciação AUG está sombreado em verde. Todos os aminoácidos, exceto a metionina e o triptofano, possuem mais de um códon. Na maioria dos casos, os códons que especificam o mesmo aminoácido diferem apenas na terceira base.

Tabela 27-4 – Degeneração do códon genético

Aminoácido	Número de códons
Ala	4
Arg	6
Asn	2
Asp	2
Cys	2
Gln	2
Glu	2
Gly	4
His	2
Ile	3
Leu	6
Lys	2
Met	1
Phe	2
Pro	4
Ser	6
Thr	4
Trp	1
Tyr	2
Val	4

Adendo 27-1 Deslocamento da janela de tradução e editoração do RNA: mRNAs que mudam as regras no meio do jogo

Uma vez estabelecida a janela de leitura durante a síntese de proteínas, os códons são traduzidos em ordem, sem sobreposição ou pontuação, até que um códon de terminação seja encontrado. Usualmente, as outras duas janelas de leituras possíveis não contêm uma informação genética útil. Entretanto, alguns poucos genes são estruturados de forma tal que os ribossomos "soluçam" em um certo ponto da tradução do mRNA, levando a uma alteração na janela de leitura a partir desse ponto. Em alguns casos, isso parece ser um mecanismo usado para produzir duas ou mais proteínas relacionadas, mas distintas, a partir de um transcrito único ou para regular a síntese de uma proteína.

Um dos exemplos mais bem documentados ocorre na tradução do mRNA para os genes *gag* e *pol* do vírus do sarcoma de Rous (veja Fig. 26-34). A janela de leitura da *pol* é deslocada para a esquerda por um par de base (janela de leitura −1) relativamente à janela de leitura para *gag* (Fig. 1).

O produto do gene *pol* (transcriptase reversa) é traduzido como uma poliproteína maior, que usa o mesmo mRNA usado para a proteína *gag* sozinha (veja Fig. 26-33). A poliproteína, ou proteína *gag-pol*, é então clivada à transcriptase reversa madura por digestão proteolítica. A produção da poliproteína requer um deslocamento da tradução na região de sobreposição, para permitir ao ribossomo contornar o códon de terminação UAG na extremidade do gene *gag* (mostrado em vermelho na Fig. 1).

Esse deslocamento ocorre em cerca de 5% dos eventos de tradução, de forma que a poliproteína *gag-pol* (e, finalmente, a transcriptase reversa) seja sintetizada em uma freqüência cerca de $^1/_{20}$ da proteína *gag*, um nível suficiente para a reprodução eficiente do vírus. Em alguns retrovírus, um outro deslocamento da janela de tradução permite a tradução de uma poliproteína ainda maior, que inclui o produto do gene *env*, fundido aos produtos gênicos *gag* e *pol* (veja Fig. 26-33). Um mecanismo semelhante é usado para produzir tanto as subunidades τ quanto as γ da DNA polimerase III da *E. coli*, a partir de um único transcrito do gene *dnaX* (veja Tabela 25-2).

Esse mecanismo também ocorre no gene do fator de liberação 2 (RF_2) da *E. coli*, discutido mais adiante neste capítulo, que é requerido para a terminação da síntese de proteínas nos códons de terminação UAA e UGA. O 26º códon no transcrito do gene para RF_2 é UGA, que normalmente interrompe a síntese de proteína. O restante do gene está em uma janela de leitura +1 (um par de bases deslocado à direita), relativa a esse códon UGA. A tradução pausa nesse códon, mas a terminação não ocorre, a menos que RF_2 seja ligada ao códon (uma ligação que é menos provável quanto menores forem os níveis de RF_2). A ausência do RF_2 previne a terminação da síntese de proteínas em UGA e dá tempo para ocorrer um deslocamento. A UGA, mais a C que se segue (UGAC), é, portanto, lida como GAC = Asp. A tradução, então, prossegue na nova janela de leitura para completar a síntese do RF_2. Dessa forma, o RF_2 regula a sua própria síntese em uma alça de retroalimentação.

Alguns mRNAs são editados antes da tradução. Os transcritos iniciais dos genes que codificam a subunidade II da citocromo oxidase na mitocôndria de alguns protistas não correspondem precisamente à seqüência necessária no carboxiterminal do produto protéico. Um processo de editoração pós-transcricional insere quatro uridinas que deslocam a janela de leitura traducional do transcrito. A Figura 2a mostra os resíduos de uridina adicionados à pequena parte do transcrito que é afetada pela editoração. Nem a função nem o mecanismo desse processo de correção são entendidos. Uma classe especial de moléculas de RNA codificadas por essas mitocôndrias foi detectada com seqüências comple-

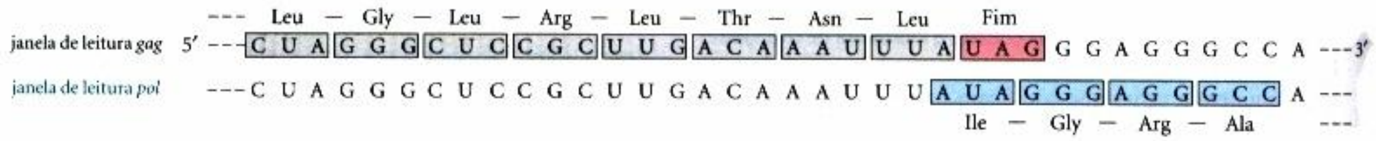

--- Leu — Gly — Leu — Arg — Leu — Thr — Asn — Leu Fim
janela de leitura gag
5′ ---C U A G G G C U C C G C U U G A C A A A U U U A U A G G G A G G G C C A ---3′
janela de leitura pol
---C U A G G G C U C C G C U U G A C A A A U U U A U A G G G A G G G C C A ---
Ile — Gly — Arg — Ala ---

Figura 1 – A região sobreposta *gag-pol* no vírus do sarcoma de Rous.

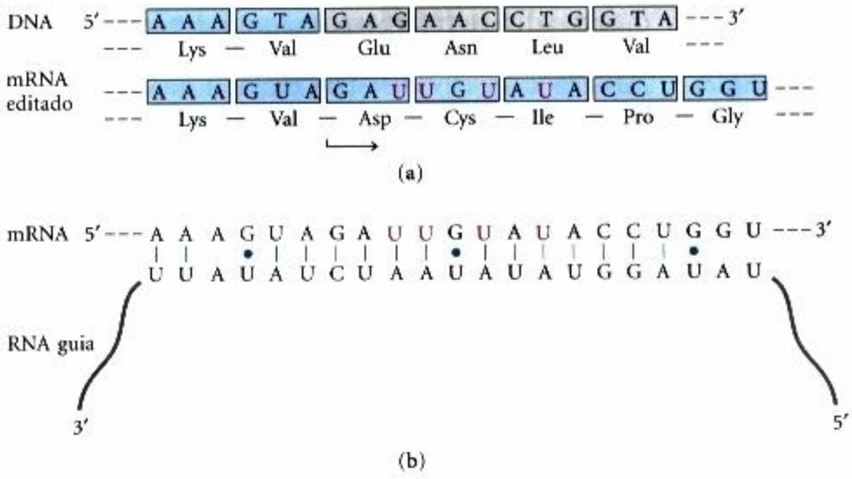

DNA 5'---A A A G T A G A G A A C C T G G T A---3'
--- Lys — Val Glu Asn Leu Val ---
mRNA editado ---A A A G U A G A U U G U A U A C C U G G U---
--- Lys — Val — Asp — Cys — Ile — Pro — Gly ---
(a)
mRNA 5'---A A G U A G A U U G U A U A C C U G G U---3'
U U A U A U C U A A U A U A U G G A U A U
RNA guia
3'
5'
(b)

Figura 2 – Editoração do RNA do transcrito do gene da subunidade II da citocromo oxidase da mitocôndria do *Trypanosoma brucei*. (**a**) Inserção de quatro resíduos de uridina produz uma janela de leitura revisada. (**b**) Uma classe especial de RNAs guia nessas mitocôndrias, complementar ao produto editado, parece agir como molde para o processo de editoração.

mentares aos mRNAs editorados. Estes, assim chamados de RNAs guia (Fig. 2b), parecem agir como moldes para o processo de editoração. Observe que o pareamento de bases envolve vários pares de bases G═U (marcados por pontos azuis), que são comuns nas moléculas de RNA.

Uma forma distinta de editoração do RNA ocorre no gene para o componente da apolipoproteína B da lipoproteína de baixa densidade nos vertebrados. Uma forma da apolipoproteína B, chamada de apoB-100 (M_r 513.000), é sintetizada no fígado; uma segunda forma, apoB-48 (M_r 250.000), é sintetizada no intestino. Ambas são sintetizadas a partir de um mRNA produzido a partir do gene para a apoB-100. A citosina deaminase, uma enzima encontrada apenas no intestino, liga-se ao mRNA no códon 2.153 (CAA = Gln) e converte a C em uma U para introduzir o códon de terminação UAA. A apoB-48, produzida no intestino a partir desse mRNA modificado, é simplesmente uma forma abreviada (correspondendo à metade aminoterminal) da apoB-100 (Fig. 3). Essa reação permite a síntese de duas proteínas diferentes, a partir de um gene em uma maneira tecido-específica.

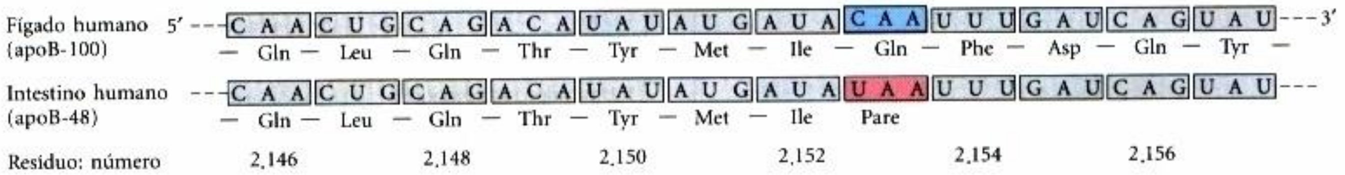

Fígado humano (apoB-100) 5'---C A A C U G C A G A C A U A U A U G A U A C A A U U U G A U C A G U A U---3'
— Gln — Leu — Gln — Thr — Tyr — Met — Ile — Gln — Phe — Asp — Gln — Tyr —
Intestino humano (apoB-48) ---C A A C U G C A G A C A U A U A U G A U A U A A U U U G A U C A G U A U---
— Gln — Leu — Gln — Thr — Tyr — Met — Ile Pare
Resíduo: número 2.146 2.148 2.150 2.152 2.154 2.156

Figura 3 – A editoração do RNA do transcrito do gene para o componente apolipoproteína B-100 das lipoproteínas de baixa densidade. A desaminação, que ocorre apenas no intestino, converte uma citosina específica em uracila, convertendo um códon de Gln a um códon de parada e produzindo uma proteína truncada.

O código genético é quase universal. Com a intrigante exceção de algumas poucas variações nas mitocôndrias, algumas bactérias e alguns eucariotos unicelulares (Adendo 27-2), os códons dos aminoácidos são idênticos em todas as espécies examinadas até agora. Os seres humanos, a *E. coli*, as plantas de tabaco, os anfíbios e os vírus compartilham o mesmo código genético. Dessa forma, parece que todas as formas de vida possuem um ancestral evolucionário comum, cujo código genético tem sido preservado durante toda a evolução biológica.

Quando vários códons diferentes especificam um aminoácido, a diferença entre eles usualmente está na terceira base (na extremidade 3'). Por exemplo, a alanina é codificada pelas trincas GCU, GCC, GCA e GCG. Os códons para a maioria dos aminoácidos podem ser simbolizados por XY^{A}_{G} ou XY^{U}_{C}. As primeiras duas letras de cada códon são, portanto, os determinantes primários da especificidade, uma característica que tem algumas conseqüências interessantes.

A oscilação permite que alguns tRNAs reconheçam mais de um códon

Os RNAs de transferência pareiam suas bases com os códons no mRNA por meio de uma seqüência de três bases no tRNA chamada de **anticódon**. A primeira base do códon no mRNA (lida na direção 5'→3') pareia com a terceira base do anticódon (Fig. 27-8a).

Se a trinca do anticódon de um tRNA reconhecesse apenas uma trinca códon por meio do pareamento de base Watson-Crick, as células teriam um tRNA diferente para cada códon de um aminoácido. Esse não é o caso. Por exemplo, os anticódons em alguns dos tRNAs contêm o nucleotídeo inosinato (designado I), que contém a base hipoxantina, pouco comum (veja Fig. 10-5b). Inosinato pode formar pontes de hidrogênio com três nucleotídeos diferentes (U, C e A; Fig. 27-8b), embora esses pareamentos sejam muito mais fracos quando comparados com as fortes pontes de hidrogênio entre os pares de bases Watson-Crick G≡C e A=U. Na levedura, um $tRNA^{Arg}$ possui o anticódon (5')ICG, que pode reconhecer três códons de arginina diferentes, (5')CGA, (5')CGU e (5')CGC. As duas primeiras bases desses códons são idênticas (CG) e formam fortes pares de bases Watson-Crick com as bases correspondentes do anticódon. A terceira base dos três códons da arginina (A, U e C) formam pontes de hidrogênio mais fracas com o resíduo I na primeira posição do anticódon.

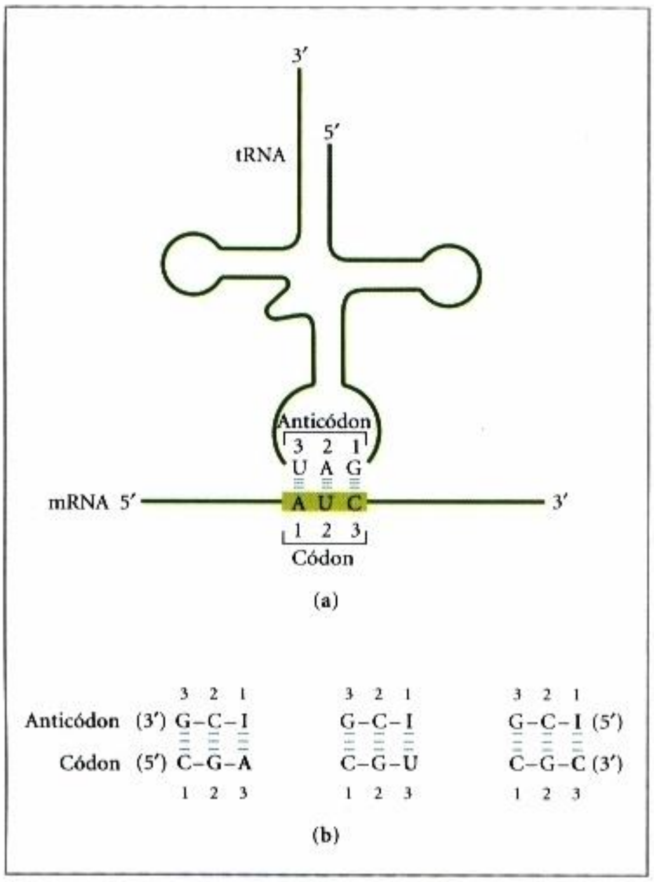


Figura 27-8 – Relações de pareamento entre o códon e o anticódon. (**a**) O alinhamento dos dois RNAs é antiparalelo. O tRNA é apresentado na configuração clássica de "folha de trevo". (**b**) Relações de pareamento do códon quando o anticódon do tRNA contém inosinato.

O exame desses e de outros pareamentos códon-anticódon levou Crick a concluir que a terceira base da maioria dos códons pareia de maneira frouxa com a base correspondente de seus anticódons; para usar sua pitoresca palavra, as terceiras bases de tais códons (e as primeiras bases de seus anticódons correspondentes) "oscilam". Crick propôs um conjunto de quatro relações, chamado de **hipótese da oscilação**:

1. As duas primeiras bases de um códon no mRNA sempre formam fortes pares de bases Watson-Crick com as bases correspondentes do anticódon no tRNA e conferem a maior parte da especificidade da codificação.
2. A primeira base do anticódon (lida na direção 5'→3'; esta pareia com a terceira base do códon) determina o número de códons reconhecidos pelo tRNA. Quando a primeira base do anticódon é C ou A, a ligação é específica e apenas um códon é reconhecido por esse tRNA. Quando a primeira base é U ou G, a ligação é menos específica e dois códons diferentes podem ser lidos. Quando o inosinato (I) for o primeiro (oscilante) nucleotídeo de um anticódon, três códons diferentes podem ser reconhecidos — o número máximo para qualquer tRNA. Essas relações estão resumidas na Tabela 27-5.
3. Quando um aminoácido for especificado por vários códons diferentes, os códons que diferem em uma das duas primeiras bases requerem tRNAs diferentes.
4. Um mínimo de 32 tRNAs são requeridos para traduzir todos os 61 códons.

A base oscilante (ou terceira) do códon contribui para a especificidade, mas, pelo fato de ela parear apenas fracamente com sua base correspondente no anticódon, ela permite rápida dissociação do tRNA de seu códon, durante a síntese de proteínas. Se todas as três bases dos códons estivessem engajadas em pareamentos Watson-Crick fortes com as três bases dos antícó-

Tabela 27-5 – Como a base oscilante do anticódon determina quantos códons de um dado aminoácido um tRNA pode reconhecer*

1. Um códon reconhecido:			
	Anticódon	(3') X–Y–**C** (5')	(3') X–Y–**A** (5')
	Códon	(5') Y–X–**G** (3')	(5') Y–X–**U** (3')
2. Dois códons reconhecidos:			
	Anticódon	(3') X–Y–**U** (5')	(3') X–Y–**G** (5')
	Códon	(5') Y–X–$\substack{\mathbf{A}\\ \mathbf{G}}$ (3')	(5') Y–X–$\substack{\mathbf{C}\\ \mathbf{U}}$ (3')
3. Três códons reconhecidos:			
	Anticódon	(3') X–Y–**I** (5')	
	Códon	(5') Y–X–$\substack{\mathbf{A}\\ \mathbf{U}\\ \mathbf{C}}$ (3')	

*X e Y denotam bases complementares capazes de fazer fortes pareamentos de bases do tipo Watson-Crick entre si. As bases oscilantes, na posição 3' dos códons e na posição 5' dos anticódons, estão sombreadas em vermelho.

dons, os tRNAs se dissociariam muito lentamente, o que limitaria severamente a velocidade da síntese de proteínas. As interações códon-anticódon otimizam tanto a exatidão quanto a velocidade.

Genes sobrepostos em janelas de leitura diferentes são encontrados em alguns DNAs virais

Embora uma certa seqüência nucleotídica possa, em princípio, ser lida em qualquer uma de suas três janelas de leitura, a maioria das seqüências do DNA codifica um produto protéico em apenas uma janela de leitura. Para gerar proteínas a partir de diferentes janelas de leitura, os códons de terminação não podem surgir na nova seqüência e cada códon deve corresponder a um aminoácido adequado. O código genético impõe limites estritos ao número de aminoácidos que podem ser codificados pela janela de leitura 2, sem alterar os aminoácidos especificados pela janela de leitura 1 (Fig. 27-9). Algumas vezes, um aminoácido (e seu códon correspondente) pode ser substituído por outro na janela de leitura 1 e ainda reter a função da proteína codificada, tornando mais plausível que as janelas de leitura 2 e 3 possam também codificar uma proteína útil; mas, mesmo levando esses fatores em conta, a flexibilidade nas outras janelas é muito limitada.

Geralmente, apenas uma janela de leitura é usada para codificar uma proteína e os genes não se sobrepõem, mas há algumas exceções interessantes. Em vários vírus, a mesma seqüência do DNA codifica duas proteínas diferentes, empregando duas janelas de leitura diferentes. O DNA do bacteriófago ϕX174, que contém 5.386 resíduos de nucleotídeos, não é suficientemente longo para codificar as dez proteínas diferentes que são conhecidas como produtos do genoma do ϕX174. Uma comparação da seqüência de nucleotídeos do cromossomo ϕX174 com as seqüências de aminoácidos das proteínas que ele codifica revela várias sobreposições nas seqüências gênicas. A Figura 27-10a mostra que o gene B está aninhado dentro do gene A e a maior parte do gene E está dentro do gene D; a Figura 27-10b esquematiza a sobreposição dos genes K, A e C. Em vários casos, o códon de iniciação de um gene se sobrepõe ao códon de terminação do outro gene. Esse aninhamento e essa sobreposição de seqüências explicam o tamanho incrivelmente pequeno do genoma do ϕX174, comparado com o número de resíduos de aminoácidos nas dez proteínas que ele codifica.

Observações semelhantes têm sido feitas em DNAs virais do fago λ e do vírus causador do câncer do símio 40 (SV40), e nos fagos de RNA, tais como o Qβ, Q17 e o fago G4, um parente próximo do ϕX174. Genes sobrepostos ou genes dentro de genes podem oferecer aos vírus uma vantagem seletiva, pois o pequeno tamanho do capsídeo viral encoraja o uso econômico de uma quantidade limitada de DNA para codificar a variedade de proteínas necessárias para infectar e replicar dentro de uma célula hospedeira. À medida que os vírus se reproduzem (e, portanto, se desenvolvem) mais rápido do que as suas células hospedeiras, eles podem representar um limite na eficiência biológica.

O código genético nos mostra como a informação da seqüência de proteína é armazenada nos ácidos nucléicos e nos fornece algumas indicações de como aquela informação é traduzida em proteína. Voltemo-nos, agora, aos mecanismos moleculares do processo de tradução.

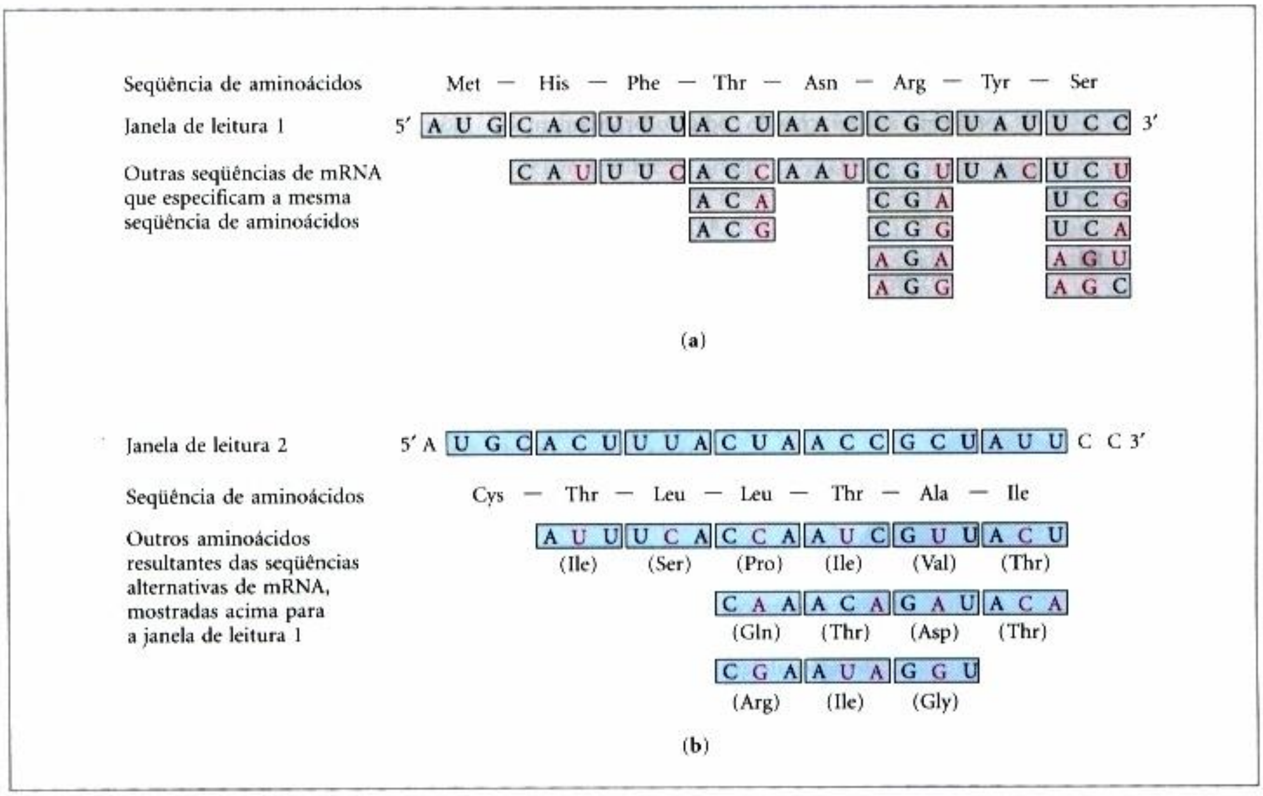

Seqüência de aminoácidos
Met — His — Phe — Thr — Asn — Arg — Tyr — Ser
Janela de leitura 1
5′ A U G C A C U U U A C U A A C C G C U A U U C C 3′
Outras seqüências de mRNA que especificam a mesma seqüência de aminoácidos
C A U U U C A C C A A U C G U U A C U C U
A C A C G A U C G
A C G C G G U C A
A G A A G U
A G G A G C
(a)
Janela de leitura 2
5′ A U G C A C U U U A C U A A C C G C U A U U C C 3′
Seqüência de aminoácidos
Cys — Thr — Leu — Leu — Thr — Ala — Ile
Outros aminoácidos resultantes das seqüências alternativas de mRNA, mostradas acima para a janela de leitura 1
A U U U C A C C A A U C G U U A C U
(Ile) (Ser) (Pro) (Ile) (Val) (Thr)
C A A A C A G A U A C A
(Gln) (Thr) (Asp) (Thr)
C G A A U A G G U
(Arg) (Ile) (Gly)
(b)

Figura 27-9 – Janela de leitura e seqüência de aminoácido. Uma seqüência de aminoácidos, especificada por uma janela de leitura, limita extremamente o potencial de aminoácidos codificado por qualquer outra janela de leitura. (**a**) Os códons da janela de leitura 1 que podem produzir a seqüência de aminoácidos indicada. A maioria das alterações nucleotídicas permitidas (vermelho) está na terceira posição (oscilante) de cada códon. (**b**) No topo são mostrados os códons que podem existir na janela de leitura 2, sem alterar a seqüência de aminoácido codificado pela janela de leitura 1. Abaixo, são mostrados os códons alternativos que correspondem às seqüências alternativas do mRNA listadas em (**a**). Os possíveis aminoácidos que podem ser codificados pela janela de leitura 2, sem alterar a seqüência de aminoácidos codificada pela janela de leitura 1, estão entre parênteses.

Adendo 27-2 Variações naturais no código genético

Na bioquímica, como em outras disciplinas, exceções às regras gerais podem ser problemáticas para os educadores e frustrantes para os estudantes. Ao mesmo tempo, elas nos ensinam que a vida é complexa e nos inspiram a procurar outras surpresas. Entender as exceções pode, de maneiras surpreendentes, até reforçar a regra geral.

Poderíamos esperar pouco espaço para variação no código genético. Até mesmo uma única substituição de aminoácido pode ter efeitos profundamente deletérios na estrutura de uma proteína. Não obstante, variações no código ocorrem em alguns organismos, e elas são tanto interessantes como instrutivas. A raridade e os tipos de variações fornecem poderosa evidência para uma origem evolucionária comum a todos os seres vivos.

Para alterar o código, alterações devem ocorrer em um ou mais tRNAs, sendo o anticódon o alvo óbvio para essas alterações. Tal alteração levaria à inserção automática de um aminoácido em um códon que não especifica aquele aminoácido, de acordo com o código normal (veja Fig. 27-7). O código genético, com efeito, é definido por dois elementos: (1) os anticódons nos tRNAs (que determinam onde um aminoácido está colocado em um polipeptídeo em crescimento) e (2) a especificidade das enzimas — aminoacil-tRNA sintetases — que carregam os tRNAs e determinam a identidade dos aminoácidos ligados a um certo tRNA.

A maioria das alterações abruptas do código teria efeitos catastróficos nas proteínas celulares, de forma que as alterações do código ocorreriam, mais provavelmente, em casos nos quais relativamente poucas proteínas seriam afetadas. Isso poderia ocorrer em genomas pequenos, que codificam apenas algumas proteínas. As conseqüências biológicas de uma alteração de código poderiam também ser limitadas por alterações restritas aos três códons de terminação, pelo fato de eles geralmente não ocorrerem dentro dos genes (veja no Adendo 27-1 as exceções a *essa* regra). Esse padrão é de fato observado.

A maioria das variações muito raras conhecidas do código genético ocorre no DNA mitocondrial (mtDNA), que codifica apenas de 10 a 20 proteínas. As mitocôndrias possuem os seus próprios tRNAs, e as variações do código não afetam o genoma celular, que é muito maior. As alterações mais comuns nas mitocôndrias e as únicas alterações observadas nos genomas celulares envolvem códons de terminação. Essas alterações afetam a terminação nos produtos de apenas um subconjunto de genes, e, às vezes, os efeitos nesses genes são menores, porque os genes possuem múltiplos códons de terminação (redundantes).

Na mitocôndria, as alterações podem ser vistas como uma espécie de eficiência genética. Os mtDNAs de vertebrados possuem genes que codificam 13 proteínas, 2 rRNAs e 22 tRNAs (veja Fig. 19-30). Um conjunto não usual de regras de oscilação permite que os 22 tRNAs decodifiquem todas as 64 trincas códons possíveis — e não todos os 32 tRNAs requeridos para o código normal. Quatro famílias de códons (nas quais o aminoácido é determinado inteiramente pelos primeiros dois nucleotídeos) são decodificadas por um único tRNA com um U na primeira (ou oscilante) posição no anticódon. Ou U pareia de alguma forma com qualquer uma das quatro bases na terceira posição do códon, ou é usado, nesses casos, um mecanismo "dois em três" — ou seja, nenhum pareamento é necessário na terceira posição do códon. Outros tRNAs reconhecem códons com A ou G na terceira posição, e ainda outros reconhecem U ou C, de forma que, virtualmente, todos os tRNAs reconhecem dois ou quatro códons.

No código normal, apenas dois aminoácidos são especificados por códons únicos, a metionina e o triptofano (veja Tabela 27-4). Se todos os tRNAs mitocondriais reconhecem dois códons, então códons adicionais para Met e Trp podem ser esperados na mitocôndria. Por isso, nós encontramos que a variação do código mais comumente observada é que UGA especifica não terminação, mas triptofano. O tRNA^{Trp} reconhece e insere um resíduo de Trp no códon de terminação UGA e no códon do Trp normal UGG. A conversão da AUA de um códon de Ile para um códon de Met tem efeito semelhante; o códon Met normal é AUG e um único tRNA pode reconhecer ambos os códigos. Essa é a segunda variação mais comum do código mitocondrial. As variações de código conhecidas na mitocôndria estão resumidas na Tabela 1.

Voltando às alterações muito mais raras nos códigos dos genomas celulares (distintos do genoma mitocondrial), concluímos que a única variação conhecida em um procarioto é, novamente, o uso do UGA para codificar resíduos de Trp na mais simples célula de vida livre, o *Mycoplasma capricolum*. Entre os eucariotos, as únicas alterações do código extramitocondrial conhecidas ocorrem em algumas poucas espécies de protistas ciliados, nos quais os códons de terminação, UAA e UAG, especificam glutamina.

As alterações no código não necessitam ser absolutas — um códon não precisa sempre codificar o mesmo aminoácido. Na *E. coli*, há dois exemplos de aminoácidos sendo inseridos em posições não especificadas no código geral. O primeiro é o uso

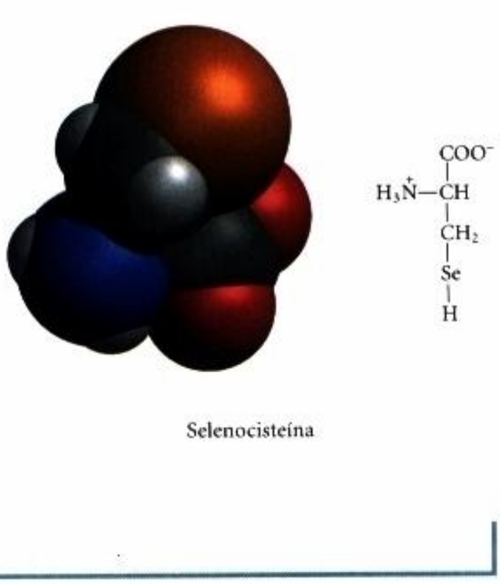
Tabela 1 – Variação na designação de códons conhecidos na mitocôndria

	Códons*				
	UGA	AUA	AGA AGG	CUN	CCG
Designação do código normal	**Fim**	**Ile**	**Arg**	**Leu**	**Arg**
Animais					
Vertebrados	Trp	Met	Fim	+	+
Drosophila	Trp	Met	Ser	+	+
Leveduras					
Saccharomyces cerevisiae	Trp	Met	+	Thr	+
Torulopsis glabrata	Trp	Met	+	Thr	?
Schizosaccharomyces pombe	Trp	+	+	+	+
Fungos filamentosos	Trp	+	+	+	+
Tripanossomos	Trp	+	+	+	+
Vegetais superiores	+	+	+	+	Trp
Chlamydomonas reinhardtii	?	+	+	+	?

*A interrogação indica que o códon não foi observado no genoma mitocondrial indicado; N, qualquer nucleotideo; +, o códon tem o mesmo significado que no código normal.

ocasional do códon GUG (Val) como um códon de iniciação. Isso ocorre apenas naqueles genes em que a GUG está apropriadamente localizada próxima às seqüências específicas do mRNA que afetam a iniciação da tradução (como será discutido posteriormente neste capítulo). Sinais contextuais que alteram os padrões do código também ocorrem no segundo exemplo da *E. coli*. Algumas proteínas, em todas as células (por exemplo, a formato desidrogenase nas bactérias e a glutationa peroxidase nos mamíferos), requerem o elemento selênio para a sua atividade. Ele está geralmente presente na forma do aminoácido modificado selenocisteína. Embora aminoácidos modificados sejam geralmente produzidos em reações pós-traducionais (descritas neste capítulo), na *E. coli*, a selenocisteína é introduzida na formato desidrogenase durante a tradução, em resposta a um códon UGA. Um tipo especializado de tRNA da serina, presente em níveis menores que outros tRNAs da serina, reconhece UGA e nenhum outro códon. Esse tRNA é carregado com serina e a serina é, então, enzimaticamente convertida a selenocisteína, antes do seu uso no ribossomo. O tRNA carregado não reconhecerá nenhum códon UGA; em vez disso, algum sinal contextual no mRNA, ainda a ser identificado, permite ao tRNA reconhecer apenas aqueles poucos códons UGA que especificam selenocisteína dentro de certos genes. Com efeito, há 21 aminoácidos-padrão na *E. coli*, e a UGA desdobra-se tanto como um códon de terminação como (algumas vezes) para a selenocisteína.

Essas variações nos mostram que o código não é tão universal quanto se acreditava, mas que sua flexibilidade é muito restrita. As variações são obviamente derivadas do código geral, e nenhum exemplo de um código completamente diferente jamais foi encontrado. O escopo limitado das variantes do código reforça o princípio de que toda vida deste planeta evoluiu tendo como base um único (levemente flexível) código genético.



Selenocisteína

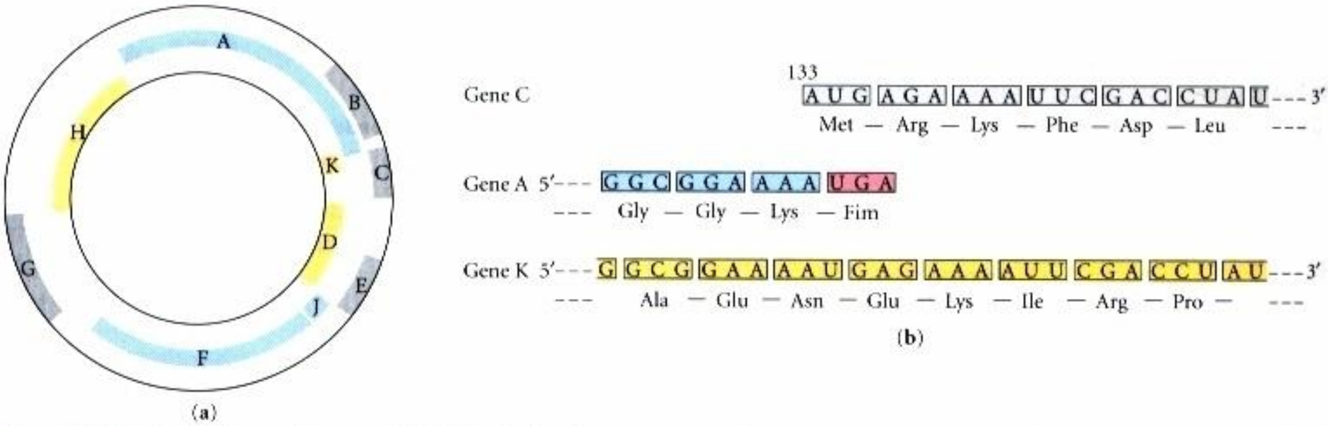

A
B
H
K
C
D
G
E
J
F
(a)
133
Gene C
AUG AGA AAA UUC GAC CUA U---3′
Met — Arg — Lys — Phe — Asp — Leu ---
Gene A 5′--- GGC GGA AAA UGA
--- Gly — Gly — Lys — Fim
Gene K 5′--- G GCG GAA AAU GAG AAA AUU CGA CCU AU---3′
--- Ala — Glu — Asn — Glu — Lys — Ile — Arg — Pro — ---
(b)

Figura 27-10 – Genes dentro de genes. (**a**) O DNA circular do ϕX174 contém dez genes (de A a K), mostrados aqui em arcos concêntricos, que correspondem às suas janelas de leitura. O gene B está dentro da seqüência do gene A, mas usa uma janela de leitura diferente. De forma semelhante, o gene E está principalmente dentro do gene D, mas também se sobrepõe com o gene J, cada gene usando uma janela de leitura diferente. O gene K se sobrepõe com os genes A, B e C. Os segmentos não sombreados são regiões espaçadoras não traduzidas. (**b**) Parte da seqüência nucleotídica do mRNA transcrito dos genes C, A e K do DNA do ϕX174. Quatro bases são usadas em todos os três genes, em diferentes janelas de leitura. Uma região de K, no lado 5′ (não mostrado), também se sobrepõe a um terceiro gene, B.

Síntese Protéica

Como vimos em relação ao DNA e ao RNA, a síntese das biomoléculas poliméricas pode ser considerada em termos de iniciação, alongamento e terminação. Esses processos fundamentais são tipicamente apoiados por duas etapas adicionais: a ativação dos precursores antes da síntese e o processamento pós-sintetizante do polímero completo. A síntese de proteínas segue esse padrão. A ativação dos aminoácidos, antes da sua incorporação aos polipeptídeos, e o processamento pós-traducional do polipeptídeo completo desempenham papéis importantes específicos na garantia tanto da fidelidade da síntese como da própria função do produto protéico. Os componentes celulares envolvidos nas cinco etapas da síntese de proteínas na *E. coli* e outras bactérias estão listados na Tabela 27-6; os requerimentos nas células eucarióticas são bastante semelhantes, embora os componentes sejam, em alguns casos, mais numerosos.

Uma visão geral das cinco etapas da síntese de proteínas fornece um esquema útil para a discussão que se segue.

Etapa 1: Ativação dos aminoácidos. A síntese de um polipeptídeo com uma seqüência definida exige que dois requerimentos químicos fundamentais sejam satisfeitos: (1) o grupo carboxila de cada aminoácido deve ser ativado para facilitar a formação de uma ligação peptídica, e (2) um elo deve estabelecer-se entre cada novo aminoácido e a informação que o codifica no mRNA. Ambos os requerimentos são satisfeitos pela ligação do aminoácido correto a um tRNA, na primeira etapa da síntese de proteínas. Ligar o aminoácido correto ao tRNA certo é crítico. Essa reação se realiza no citosol, e não no ribossomo. Cada um dos 20 aminoácidos é covalentemente ligado a um tRNA específico, às expensas da energia do ATP, usando enzimas ativadoras dependentes de Mg^{2+}, chamadas de aminoacil-tRNA sintetases. Os tRNAs aminoacilados são comumente referidos como estando "carregados".

Etapa 2: Iniciação. Em seguida, o mRNA que contém o código para o polipeptídeo a ser sintetizado liga-se à menor das duas subunidades ribossômicas e ao aminoacil-tRNA de iniciação. A subunidade ribossômica maior, então, liga-se para formar um complexo de iniciação. O aminoacil-tRNA de iniciação pareia com o códon AUG do mRNA, que sinaliza o início da cadeia polipeptídica. Esse processo, que requer GTP, é promovido por proteínas citosólicas específicas, chamadas de fatores de iniciação.

Tabela 27-6 – Componentes requeridos para as cinco principais etapas na síntese de proteínas na *E. coli*

Etapa	Componentes necessários
1. Ativação dos aminoácidos	20 aminoácidos 20 aminoacil-tRNA sintetases 20 ou mais tRNAs ATP Mg^{2+}
2. Iniciação	mRNA *N*-Formilmetionil-tRNA Códon de iniciação no mRNA (AUG) Subunidade ribossômica 30S Subunidade ribossômica 50S Fatores de iniciação (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg^{2+}
3. Alongamento	Ribossomo 70S funcional (complexo de iniciação) Aminoacil-tRNAs especificados pelos códons Fatores de alongamento (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) GTP Mg^{2+}
4. Terminação e liberação	Códon de terminação no mRNA Fatores de liberação de polipeptídeos (RF_1, RF_2, RF_3) ATP
5. Enovelamento e processamento pós-traducional	Enzimas, co-fatores e outros componentes específicos para a remoção de resíduos iniciais e seqüências sinalizadoras, processamento proteolítico adicional, modificação dos resíduos terminais e ligação dos grupos fosfato, metila, carboxila, carboidrato ou prostético

Etapa 3: Alongamento. O polipeptídeo nascente é agora alongado pela ligação covalente de sucessivas unidades de aminoácidos, cada um transportado ao ribossomo e corretamente posicionado pelo seu tRNA, que pareia com o seu códon correspondente no mRNA. O alongamento é promovido por proteínas citosólicas chamadas de fatores de alongamento. A ligação de cada aminoacil-tRNA que chega e o movimento do ribossomo ao longo do mRNA são facilitados pela hidrólise do GTP à medida que cada resíduo é adicionado ao polipeptídeo crescente.

Etapa 4: Terminação e liberação. O término da cadeia polipeptídica é sinalizado por um códon de terminação no mRNA. A nova cadeia polipeptídica é então liberada do ribossomo, ajudada por proteínas chamadas de fatores de liberação.

Etapa 5: Enovelamento e processamento pós-traducional. Para alcançar sua forma biologicamente ativa, o novo polipeptídeo deve enrolar-se na sua conformação tridimensional apropriada. Antes ou depois do enovelamento, o novo polipeptídeo pode sofrer processamento enzimático, incluindo remoção de um ou mais aminoácidos a partir do aminoterminal; a adição de acetila, fosfato, metila, carboxila, ou outros grupos, a certos resíduos de aminoácidos; a clivagem proteolítica; ou a ligação de oligossacarídeos ou grupos prostéticos.

Antes de examinarmos essas cinco etapas em detalhe, devemos introduzir dois componentes-chave na biossíntese de proteínas: o ribossomo e os tRNAs.

O ribossomo é uma máquina supramolecular complexa

Cada célula da *E. coli* contém 15.000 ou mais ribossomos, que perfazem quase um quarto do peso seco da célula. Os ribossomos bacterianos contêm cerca de 65% de rRNA e cerca de 35% de proteínas; eles possuem um diâmetro de cerca de 18nm e são compostos de duas subunidades desiguais, com coeficientes de sedimentação de 30S e 50S e um coeficiente de sedimentação das subunidades combinadas de 70S. Ambas as subunidades contêm proteínas ribossomais e, pelo menos, um rRNA (Tabela 27-7).

Tabela 27-7 – RNA e componentes protéicos do ribossomo da *E. coli*

Subunidade	Número de proteínas diferentes	Número total de proteínas	Designações protéicas	Número e tipo de rRNAs
30S	21	21	S1-S21	1 (16S rRNA)
50S	33	36	L1-L36*	2 (5S e 23S rRNAs)

*As designações protéicas de L1 até L36 não correspondem a 36 proteínas diferentes. A proteína originalmente designada L7 é, de fato, uma forma modificada da L12, e a L8 é um complexo de três outras proteínas. Também, a L26 provou ser a mesma proteína que a S20 (e não parte da subunidade 50S). Isso soma 33 proteínas diferentes na subunidade maior. Há quatro cópias da proteína L7-L12, com as três cópias extras elevando as proteínas totais a 36.

As estruturas tridimensionais das subunidades ribossomais da *E. coli* foram deduzidas (embora não exatamente com a resolução molecular) a partir de uma combinação da difração de raios X, eletromicroscopia e outros métodos estruturais (Fig. 27-11). As duas subunidades de formas irregulares se encaixam formando uma fenda, através da qual passa o mRNA à medida que o ribossomo se move ao longo do mRNA durante a tradução.

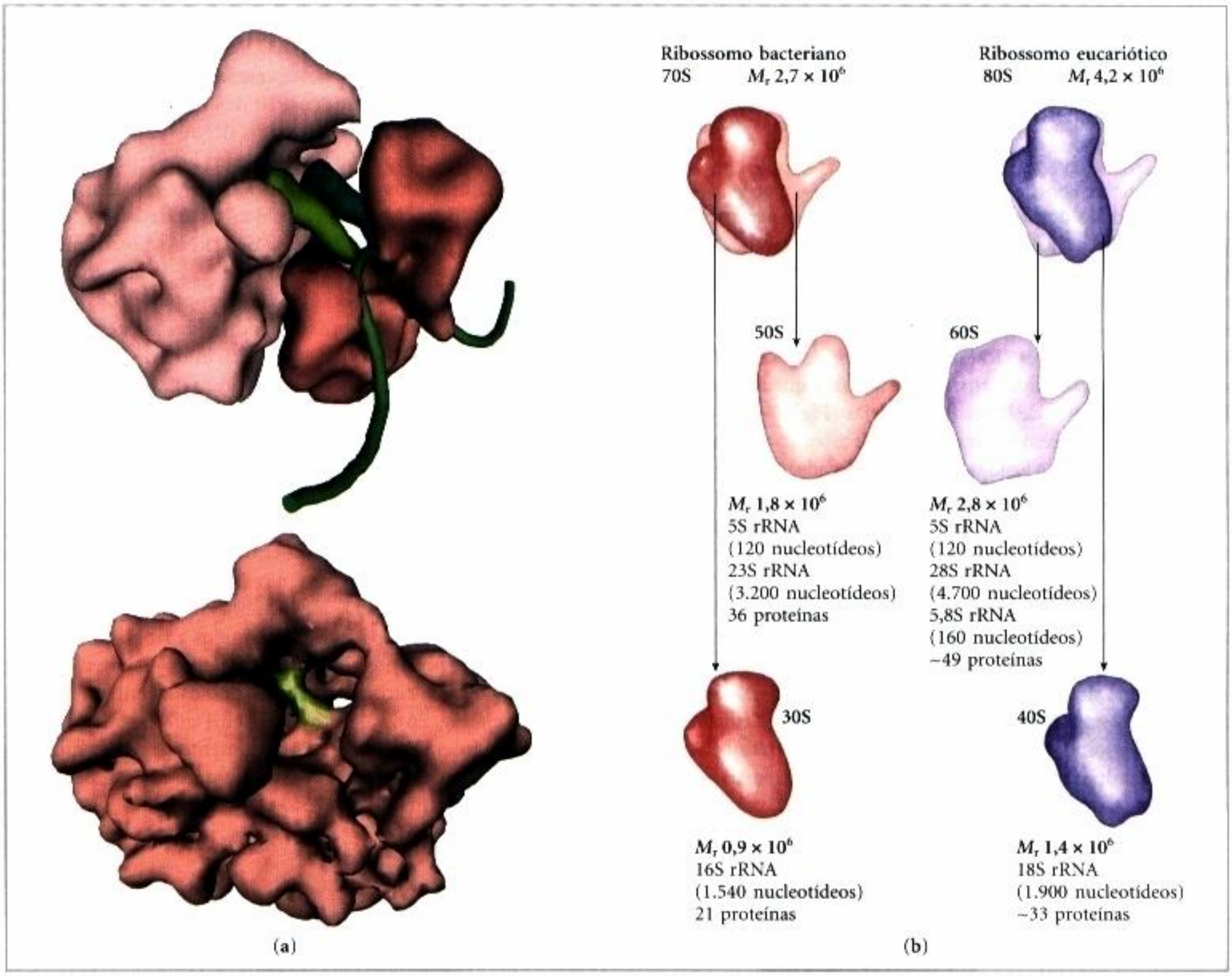

Ribossomo bacteriano
70S M_r 2,7 × 10^6
Ribossomo eucariótico
80S M_r 4,2 × 10^6
50S
60S
M_r 1,8 × 10^6
5S rRNA
(120 nucleotídeos)
23S rRNA
(3.200 nucleotídeos)
36 proteínas
M_r 2,8 × 10^6
5S rRNA
(120 nucleotídeos)
28S rRNA
(4.700 nucleotídeos)
5,8S rRNA
(160 nucleotídeos)
~49 proteínas
30S
40S
M_r 0,9 × 10^6
16S rRNA
(1.540 nucleotídeos)
21 proteínas
M_r 1,4 × 10^6
18S rRNA
(1.900 nucleotídeos)
~33 proteínas
(a)
(b)

Figura 27-11 – Ribossomos. (**a**) Estrutura do ribossomo bacteriano na resolução quase-molecular. O modelo no topo mostra as localizações do mRNA (fio verde) e os tRNAs ligados (sombreados em verde). A subunidade maior está à esquerda, a subunidade menor à direita. A imagem embaixo é o ribossomo completo, com 15Å de resolução. As subunidades não são distinguidas, mas a orientação é semelhante àquela da imagem acima. A densidade correspondendo a um tRNA é mostrada em verde. (**b**) As subunidades ribossomais são identificadas pelo valor do seu S (unidades Svedberg), coeficientes de sedimentação que se referem às velocidades de sedimentação em uma centrífuga. Os valores de S não são necessariamente aditivos quando as subunidades são combinadas, porque as velocidades de sedimentação são afetadas pela forma, bem como pela massa.

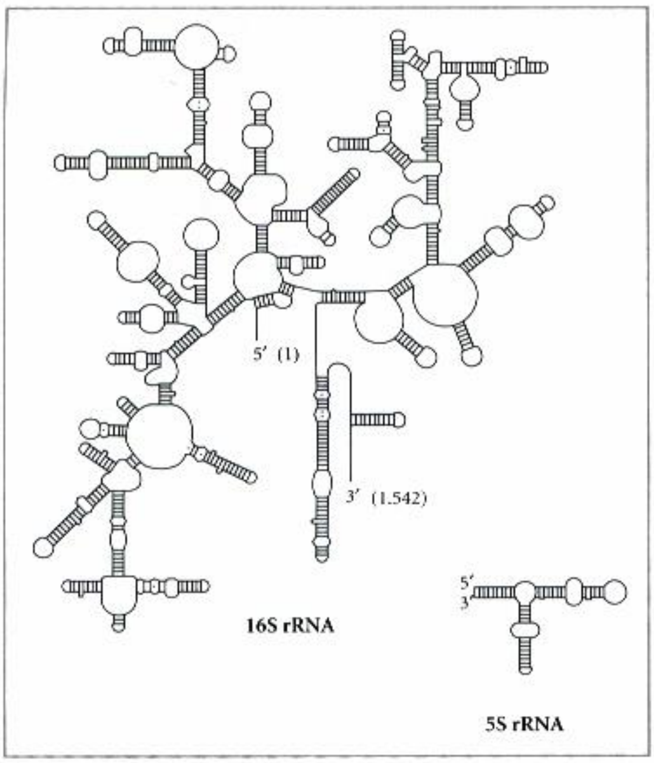


Figura 27-12 – rRNAs bacterianos. São mostrados modelos da estrutura secundária dos rRNAs 16S e 5S da *E. coli*. O primeiro (extremidade 5′) e o último (extremidade 3′) dos resíduos ribonucleotídeos do rRNA 16S estão numerados.

A variedade de proteínas nos ribossomos é enorme, com pesos moleculares variando de cerca de 6.000 a 75.000. As estruturas de muitas dessas proteínas são conhecidas, e a estrutura do ribossomo inteiro está entrando em foco (Fig. 27-11a). As seqüências dos rRNAs de muitos organismos foram determinadas. Cada um dos três rRNAs de fita simples da *E. coli* possui uma conformação tridimensional específica que apresenta extensos pareamentos de bases intracadeias (Fig. 27-12).

Os rRNAs parecem servir como um arcabouço ao qual as proteínas ribossomais são ligadas. No final da década de 1960, Masayasu Nomura e colaboradores demonstraram que ambas as subunidades ribossomais podiam ser quebradas nos seus componentes RNA e proteínas, e depois reconstituídas *in vitro*. Sob condições experimentais apropriadas, elas se montam espontaneamente, formando as subunidades 30S e 50S, quase idênticas, em estrutura e atividade, às subunidades nativas. As 55 proteínas no ribossomo bacteriano funcionam ou como enzimas ou como componentes estruturais na síntese de proteínas, embora as funções detalhadas da maioria dessas proteínas estejam ainda para ser elucidadas.

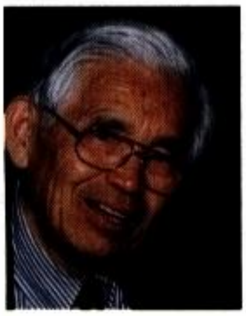
Os ribossomos das células eucarióticas (não os ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos) são maiores e mais complexos que os ribossomos bacterianos (Fig. 27-11b), com um diâmetro de cerca de 23nm e um coeficiente de sedimentação de cerca de 80S. Eles também possuem duas subunidades, que variam em tamanho entre as espécies, mas em média são de 60S e 40S. No total, os ribossomos eucarióticos contêm mais de 80 proteínas diferentes. Os ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos são um pouco menores e mais simples que os ribossomos bacterianos. Entretanto, a estrutura e a função ribossomais são impressionantemente semelhantes em todos os organismos e organelas.

Os tRNAs possuem características estruturais próprias

Para entender como os tRNAs podem funcionar como adaptadores na tradução da linguagem dos ácidos nucléicos para a linguagem das proteínas, devemos primeiro examinar a sua estrutura mais detalhadamente. Os RNAs de transferência são relativamente pequenos e consistem em uma fita simples de RNA, enrolada em uma estrutura tridimensional precisa (veja Fig. 10-28a). Os tRNAs nas bactérias e no citosol dos eucariotos possuem entre 73 e 93 resíduos de nucleotídeos, correspondendo a pesos moleculares entre 24.000 e 31.000. As mitocôndrias e os cloroplastos contêm tRNAs distintos, que são um pouco menores. As células possuem, pelo menos, uma espécie de tRNA para cada aminoácido; um mínimo de 32 tRNAs são requeridos para reconhecer todos os códons dos aminoácidos (alguns reconhecem mais de um códon), entretanto algumas células usam mais de 32.

O tRNA da alanina (tRNA^{Ala}) da levedura, o primeiro ácido nucléico a ser completamente seqüenciado (Fig. 27-13), continha 76 resíduos de nucleotídeos, 10 dos quais possuíam bases modificadas. Comparações de muitos tRNAs de várias espécies revelaram muitos denominadores comuns na estrutura (Fig. 27-14). Oito ou mais dos resíduos nucleotídeos possuem bases e açúcares modificados, muitos dos quais são derivados metilados das bases principais. A maioria dos tRNAs possui um resíduo de guanilato (pG) na extremidade 5′, e todos possuem a seqüência trinucleotídica CCA(3′) na extremidade 3′. Quando desenhados em duas dimensões, o padrão das pontes de hidrogênio de todos os tRNAs forma uma estrutura de "folha de trevo" com quatro braços; os tRNAs maiores possuem um quinto, ou extra, braço curto (Fig. 27-14). Em três dimensões, um tRNA possui a forma de um L torcido (Fig. 27-15).

Dois dos braços de um tRNA são críticos para a função de adaptador. O **braço aminoácido** pode transportar um aminoácido específico, esterificado pelo seu grupo carboxila ao grupo hidroxila 2′ ou 3′ do resíduo de adenosina na extremidade 3′ do tRNA. O **braço anticódon** contém o anticódon. Os outros braços principais são o **braço D**, que contém o nucleotídeo não usual diidrouridina, e o **braço TψC**, que contém a ribotimidina (T), não usualmente presente nos RNAs, e a pseudo-uridina (ψ), que possui uma ligação carbono-carbono não usual entre a base e a pentose (veja Fig. 26-26). Os braços D e TψC contribuem com importantes interações para o enovelamento geral das moléculas de tRNA, mas funções específicas para essas regiões ainda não foram determinadas.


Masayasu Nomura

Robert W. Holley
(1922-1993)

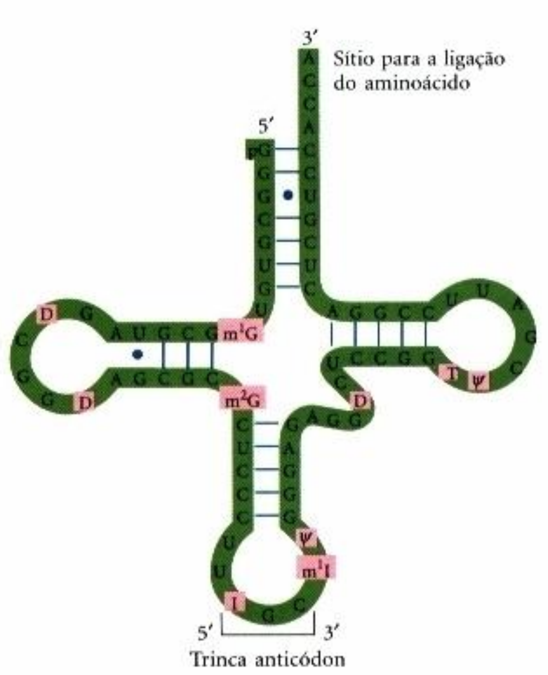

3′
Sítio para a ligação do aminoácido
5′
pG
m¹G
m²G
ψ
m¹I
T
D
I
5′
3′
Trinca anticódon

Figura 27-13 – A seqüência nucleotídica do tRNA^{Ala} da levedura. A estrutura, deduzida em 1965 por Robert W. Holley e seus colaboradores, é mostrada na conformação em "folha de trevo" na qual o pareamento de bases intracadeias é máximo. Os seguintes símbolos são usados para os nucleotídeos modificados: ψ, pseudo-uridina; I, inosina; T, ribotimidina; D, 5,6-diidrouridina; m¹I, 1-metilinosina; m¹G, 1-metilguanosina; m²G, N^2-dimetilguanosina. As bases modificadas estão sombreadas em vermelho e a maioria está ilustrada na Figura 26-26. As linhas azuis entre as secções paralelas indicam pares de bases. O anticódon pode reconhecer três códons para a alanina (GCA, GCU e GCC). Outras características da estrutura do tRNA são mostradas nas Figuras 27-14 e 27-15. Observe a presença do pareamento de bases G═U, tanto no braço aminoácido (acima) quanto no braço D (à esquerda), sinalizado com pontos azuis para indicar um pareamento diferente daquele de Watson-Crick. Nos RNAs, a guanosina é freqüentemente encontrada formando pares de bases com a uridina, embora o par G═U não seja tão estável quanto o par G≡C de Watson-Crick (Capítulo 10).

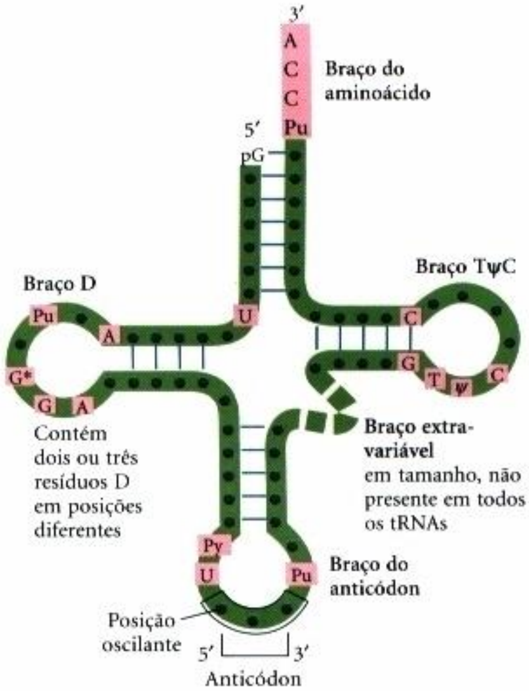

3′
A
C
C
Pu
Braço do aminoácido
5′
pG
Braço D
Braço TψC
Pu
A
G*
G
A
U
C
G
T
ψ
C
Contém dois ou três resíduos D em posições diferentes
Braço extra-variável em tamanho, não presente em todos os tRNAs
Py
U
Pu
Braço do anticódon
Posição oscilante
5′
3′
Anticódon

Figura 27-14 – Estrutura secundária geral em "folha de trevo" para todos os tRNAs. Os pontos grandes na estrutura representam resíduos de nucleotídeos e as linhas azuis representam os pareamentos de bases. Resíduos característicos e/ou invariantes, comuns a todos os tRNAs, estão sombreados em vermelho. Os RNAs de transferência variam em comprimento, de 73 a 93 nucleotídeos. Nucleotídeos extras ocorrem no braço extra ou no braço D. Na extremidade do braço do anticódon está a alça do anticódon, que sempre contém sete nucleotídeos não-pareados. O braço D contém dois ou três resíduos D, dependendo do tRNA. Em alguns tRNAs, o braço D possui apenas três pontes de hidrogênio formando pares de bases. Além dos símbolos explicados na Figura 27-13: Pu, nucleotídeo de purina; Py, nucleotídeo de pirimidina; G*, guanilato ou 2′-*O*-metilguanilato.

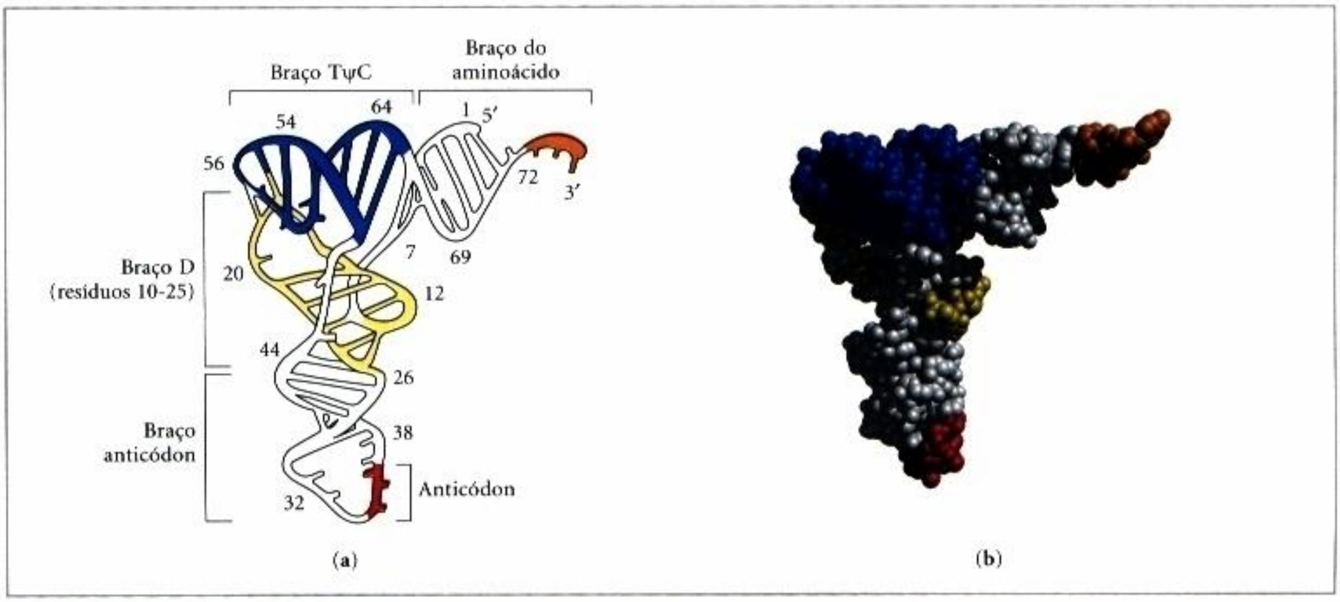

Braço TψC
Braço do aminoácido
54
64
1
5′
56
72
3′
Braço D (resíduos 10-25)
20
7
69
12
44
26
Braço anticódon
38
32
Anticódon
(a)
(b)

Figura 27-15 – Estrutura tridimensional do tRNA^{Phe} de levedura deduzida a partir da análise de difração dos raios X. A forma assemelha-se a um L torcido. (**a**) Um diagrama esquemático, com os vários braços identificados na Figura 27-14 sombreados em cores diferentes. (**b**) Um modelo espaço-cheio. O código das cores é o mesmo em ambas as representações. As três bases do anticódon são mostradas em vermelho e a seqüência CCA na extremidade 3′ (ponto de ligação para os aminoácidos) é mostrada em laranja. Os braços TψC e D estão em azul e amarelo, respectivamente.

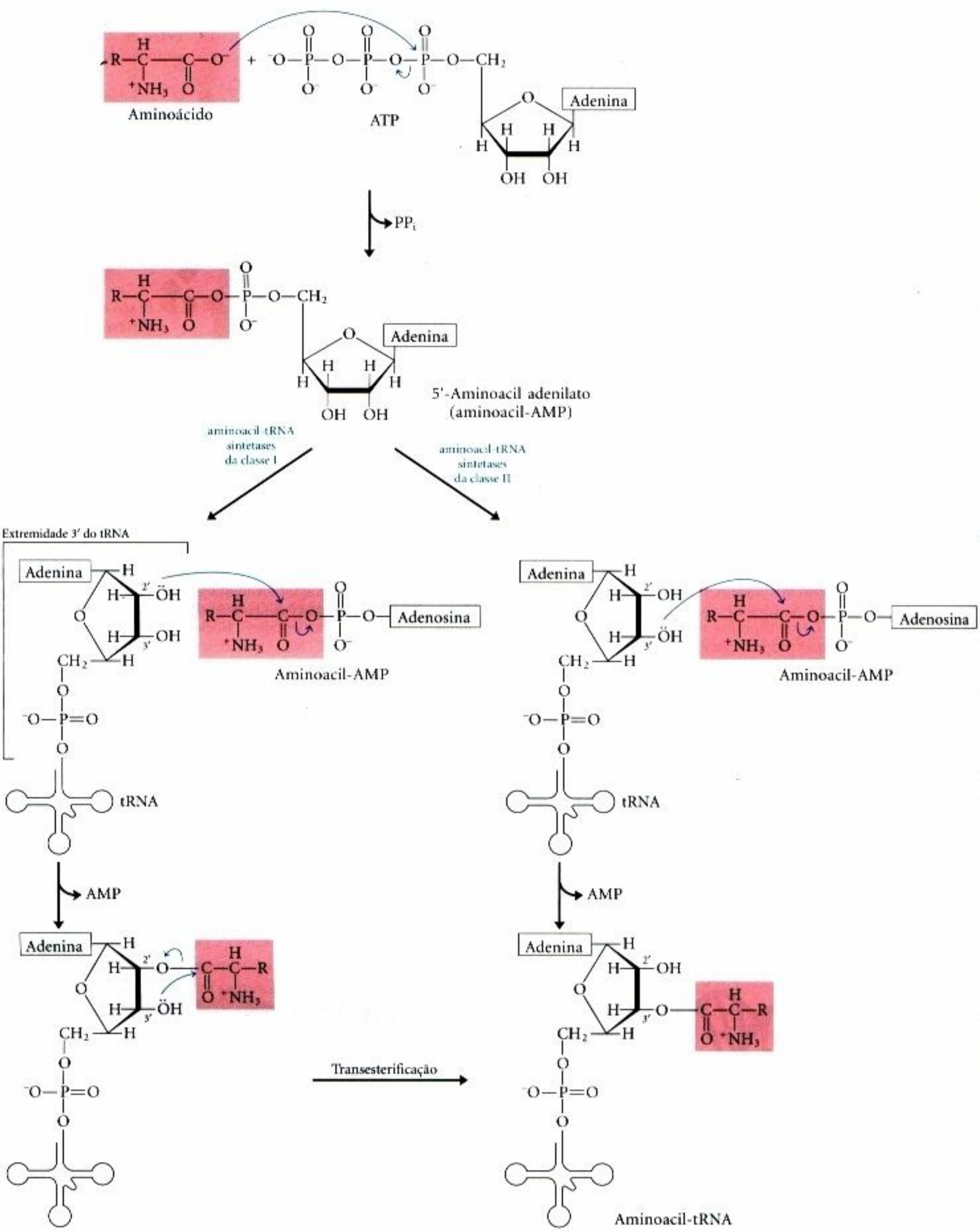

Aminoácido
ATP
Adenina
PPi
Adenina
5'-Aminoacil adenilato
(aminoacil-AMP)
aminoacil-tRNA sintetases da classe I
aminoacil-tRNA sintetases da classe II
Extremidade 3' do tRNA
Adenina
Adenosina
Aminoacil-AMP
tRNA
Adenina
Adenosina
Aminoacil-AMP
tRNA
AMP
AMP
Adenina
Adenina
Transesterificação
Aminoacil-tRNA

Figura 27-16 – Aminoacilação do tRNA pelas aminoacil-tRNA sintetases. A primeira etapa é a formação do aminoacil-adenilato, que permanece ligado ao sítio ativo da enzima. Na segunda etapa, o grupo aminoacila é transferido para o tRNA. O mecanismo dessa etapa é um tanto quanto diferente para as duas classes de aminoacil-tRNA sintetases (veja Tabela 27-8). Para as enzimas da classe I, o grupo aminoacila é transferido, inicialmente, para o grupo hidroxila 2′ do resíduo adenilato 3′ terminal e, então, transferido para a hidroxila 3′, por uma reação de transesterificação. Para as enzimas da classe II, o grupo aminoacila é transferido diretamente para a hidroxila 3′ do terminal adenilato, como mostrado.

Tendo examinado as estruturas dos ribossomos e tRNAs, consideraremos, agora, os detalhes da cinco etapas da síntese de proteínas.

Etapa 1: As aminoacil-tRNA sintetases ligam os aminoácidos corretos aos seus tRNAs

Durante a primeira etapa da síntese de proteínas, que se realiza no citosol, os 20 aminoácidos diferentes são esterificados aos seus correspondentes tRNAs pelas aminoacil-tRNA sintetases. Cada enzima é específica para um aminoácido e um ou mais tRNAs correspondentes. A maioria dos organismos possui uma aminoacil-tRNA sintetase para cada aminoácido. Para aminoácidos que possuem dois ou mais tRNAs correspondentes, a mesma enzima usualmente aminoacila todos eles.

Aproximadamente todas as aminoacil-tRNA sintetases da *E. coli* foram isoladas e algumas cristalizadas. Elas foram divididas em duas classes (Tabela 27-8), baseadas em distinções substanciais na estrutura primária e terciária e no mecanismo de reação (Fig. 27-16). As duas classes aparecem em todos os organismos e não há evidência de um ancestral comum. As razões biológicas, químicas e evolucionárias para as duas classes de enzimas envolvidas em processos essencialmente idênticos permanecem obscuras. A reação catalisada por uma aminoacil-tRNA sintetase é:

$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightleftharpoons[\text{aminoacil-tRNA sintetase}]{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Tabela 27-8 – Duas classes de aminoacil-tRNA sintetases*

Classe I	Classe II
Arg	Ala
Cys	Asn
Gln	Asp
Glu	Gly
Ile	His
Leu	Lys
Met	Phe
Trp	Pro
Tyr	Ser
Val	Thr

*Aqui, Arg representa a arginil-tRNA sintetase, e assim por diante. A classificação aplica-se a todos os organismos para os quais as tRNA sintetases foram analisadas e está baseada em distinções protéicas estruturais e no mecanismo esquematizados na Figura 27-16.

A reação de ativação ocorre em duas etapas no sítio ativo da enzima. Na primeira etapa, um intermediário ligado à enzima, aminoacil-adenilato (aminoacil-AMP), forma-se quando o grupo carboxila do aminoácido reage com o grupo fosforil do ATP para formar uma ligação anidrídica, com o deslocamento do pirofosfato. Na segunda etapa, o grupo aminoacila é transferido do aminoacil-AMP ligado à enzima para o seu tRNA específico correspondente. O curso dessa segunda etapa depende da classe à qual a enzima pertence. A ligação éster resultante entre o aminoácido e o tRNA (Fig. 27-17) possui uma energia livre padrão de hidrólise altamente negativa ($\Delta G'^{\circ} \approx -29$kJ/mol). O pirofosfato formado na reação de ativação sofre hidrólise a fosfato pela pirofosfatase inorgânica. Dessa forma, *duas* ligações fosfato de alta energia são gastas para cada molécula de aminoácido ativada, tornando a reação geral para a ativação do aminoácido essencialmente irreversível:

$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow[\substack{\text{aminoacil-tRNA sintetase} \\ \text{pirofosfatase inorgânica}}]{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + 2\text{P}_i$$

$$\Delta G'^{\circ} \approx -29\text{kJ/mol}$$

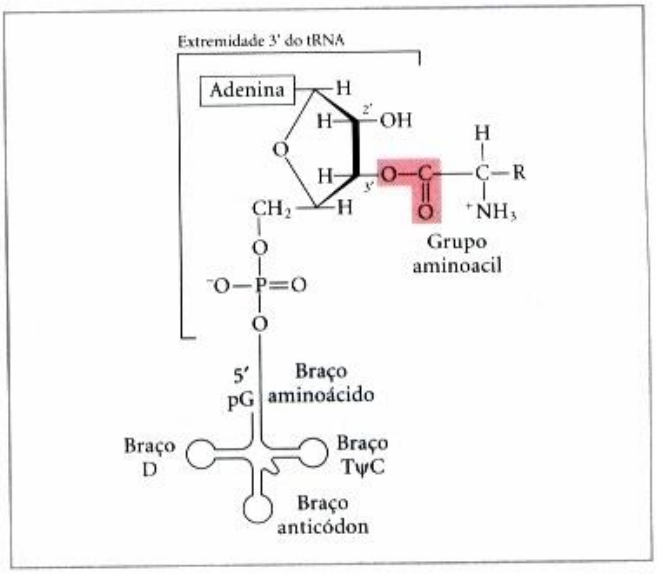
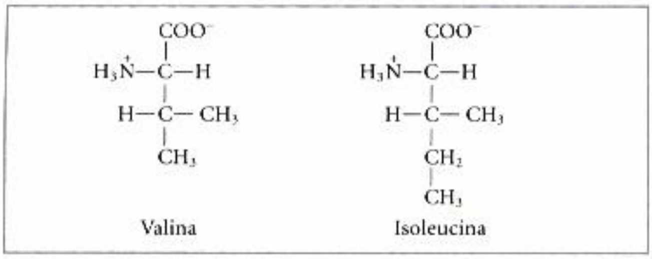


Figura 27-17 – Estrutura geral dos aminoacil-tRNAs. O grupo aminoacila é esterificado na posição 3' do resíduo adenilato terminal. A ligação éster, que tanto ativa o aminoácido como o liga ao tRNA, está sombreada em vermelho.

Revisão pelas aminoacil-tRNA sintetases. A aminoacilação do tRNA realiza (1) a ativação do aminoácido para a formação da ligação peptídica e (2) a ligação do aminoácido a um tRNA adaptador, que garante sua colocação apropriada dentro de um polipeptídeo em crescimento. A identidade do aminoácido ligado a um tRNA não é conferida no ribossomo, de forma que a ligação do aminoácido correto ao tRNA é essencial para a fidelidade da síntese de proteínas.

A especificidade enzimática é limitada pela energia de ligação disponível nas interações enzima-substrato (Capítulo 8). A discriminação entre dois substratos de aminoácidos semelhantes foi estudada em detalhe no caso da Ile-tRNA^{Ile} sintetase, que distingue entre a valina e a isoleucina, diferindo por apenas um grupo metileno (—CH_2). A Ile-tRNA^{Ile} sintetase favorece a ativação da isoleucina (para formar Ile-AMP) por um fator de 200 — como esperado, considerando a quantidade que um grupo metileno aumentaria na ligação da isoleucina sobre a valina. Ainda assim, a valina é incorporada erroneamente em proteínas, em posições normalmente ocupadas pela isoleucina, em uma freqüência de apenas cerca de 1 em 3.000. Esse aumento na acurácia de mais de dez vezes é trazido por uma função de revisão da Ile-tRNA sintetase, também presente em algumas outras aminoacil-tRNA sintetases. Lembre-se de que um princípio geral na discussão sobre a revisão pela DNA polimerase (pág. 737): se as interações de ligação disponíveis não permitirem uma discriminação suficiente entre dois substratos, a especificidade necessária pode ser alcançada pela ligação específica do substrato em *duas etapas sucessivas*. O efeito de forçar o sistema através de dois "filtros" sucessivos é multiplicador. No caso da Ile-tRNA sintetase, o primeiro filtro é a ligação inicial do aminoácido à enzima e a sua ativação em aminoacil-AMP. O segundo filtro é a ligação do aminoacil-tRNA *incorreto* a um sítio ativo separado da enzima. O grupo R da valina é levemente menor que o da isoleucina; o Val-AMP encaixa-se no sítio hidrolítico (de revisão) da Ile-tRNA sintetase, mas o Ile-AMP não. Dessa forma, o Val-AMP é hidrolisado em valina e AMP no sítio ativo de revisão, e o tRNA ligado à sintetase não se torna aminoacilado ao aminoácido errado.



Além da revisão, depois da formação do aminoacil-AMP intermediário, a maioria das aminoacil-tRNA sintetases são, também, capazes de hidrolisar a ligação éster entre os aminoácidos e os tRNAs nos aminoacil-tRNAs. Essa hidrólise é muito acelerada para os tRNAs incorretamente carregados, fornecendo, ainda, um terceiro filtro para aumentar a fidelidade do processo total. As poucas aminoacil-tRNA sintetases que ativam aminoácidos sem semelhança estrutural apresentam pouca ou nenhuma atividade de revisão; nesses casos, o sítio ativo para a aminoacilação pode discriminar adequadamente o substrato apropriado dos aminoácidos incorretos.

A freqüência total de erro da síntese de proteínas (~1 erro por 10^4 aminoácidos incorporados) não é tão baixa como para a replicação do DNA. Falhas em uma proteína são eliminadas quando a proteína é degradada e não são passadas para futuras gerações, de forma que elas possuem um significado biológico menor. O grau de fidelidade na síntese de proteínas é suficiente para garantir que muitas proteínas não contenham erro e que a grande quantidade de energia requerida para sintetizar uma proteína seja raramente desperdiçada.

A interação entre uma aminoacil-tRNA sintetase e um tRNA: um "segundo código genético". Uma aminoacil-tRNA sintetase individual deve ser específica não apenas para um único aminoácido, mas também para um determinado tRNA. Discriminar entre dúzias de tRNAs é tão importante para a fidelidade geral da biossíntese de proteínas como é distinguir entre aminoácidos. A interação entre as aminoacil-tRNA sintetases e os tRNAs tem sido referida como o "segundo código genético", para refletir seu papel crítico na manutenção da precisão da síntese das proteínas. As regras de "codificação" são aparentemente mais complexas do que aquelas do primeiro "código".

A **Figura 27-18** resume o que é conhecido sobre os nucleotídeos envolvidos no reconhecimento por algumas ou por todas as aminoacil-tRNA sintetases. Alguns nucleotídeos são conservados em todos os tRNAs e, portanto, não podem ser usados para a discriminação. As posições nucleotídicas envolvidas na discriminação pelas aminoacil-tRNA sintetases têm sido identificadas ao observar-se que mudanças, naqueles nucleotídeos, alteram a especificidade do substrato da enzima. Essas interações parecem estar concentradas no braço do aminoácido e no braço do anticódon, incluindo os nucleotídeos do próprio anticódon, mas também estão localizadas em outras partes da molécula. A determinação das estruturas cristalinas das aminoacil-tRNA sintetases, complexadas com os seus tRNAs e ATP, contribuiu muito para o nosso entendimento dessas interações (Fig. 27-19).

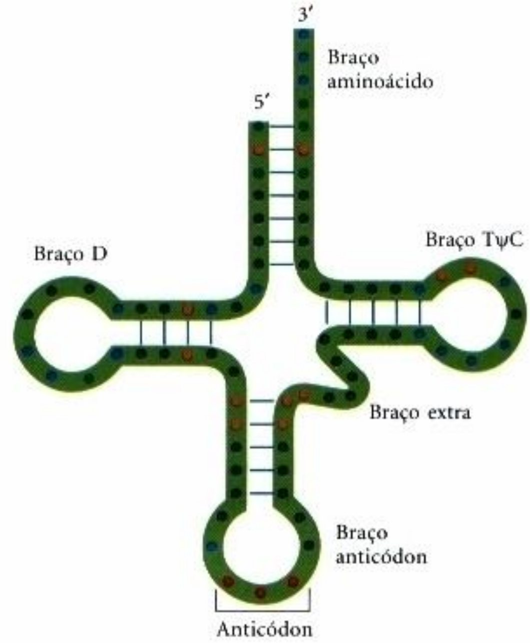


Figura 27-18 – Posições conhecidas nos tRNAs, reconhecidas pelas aminoacil-tRNA sintetases. As posições em azul são as mesmas em todos os tRNAs e, portanto, não podem ser usadas para discriminar uns dos outros. Outras posições são pontos de reconhecimento conhecidos para uma (laranja) ou mais (verde) tRNA sintetases. Características estruturais, que não a seqüência, são importantes para o reconhecimento por algumas das sintetases.

Dez ou mais nucleotídeos específicos podem estar envolvidos no reconhecimento de um tRNA pela sua aminoacil-tRNA sintetase específica. Ao contrário, ao longo de uma série de organismos, das bactérias ao homem, o determinante primário para o reconhecimento do tRNA pela Ala-tRNA sintetase é um único par de bases, G═U, no braço do aminoácido do $tRNA^{Ala}$ (Fig. 27-20a). Um RNA curto, com apenas sete pares de bases arranjadas em uma mini-hélice de um grampo simples, é eficientemente aminoacilado pela Ala-tRNA sintetase, desde que o RNA contenha esse G═U crítico (Fig. 27-20b). Esse sistema relativamente simples da alanina pode ser um resto evolucionário de um período no qual oligonucleotídeos de RNA, ancestrais do tRNA, eram aminoacilados em um sistema primitivo de síntese de proteínas.

Etapa 2: Um aminoácido específico inicia a síntese de proteínas

A síntese de proteínas começa na extremidade aminoterminal e prossegue pela adição, passo a passo, dos aminoácidos, até a extremidade carboxiterminal do polipeptídeo, como foi determinado por Howard Dintzis, em 1961 (Fig. 27-21). O códon de iniciação AUG, dessa forma, especifica um resíduo metionina *aminoterminal*. Embora a metionina possua apenas um códon, (5′)AUG, todos os organismos possuem dois tRNAs para a metionina. Um é usado exclusivamente quando (5′)AUG é o códon de iniciação para a síntese de proteínas. O segundo é usado para codificar metionina em uma posição interna em um polipeptídeo.

A distinção entre um (5′)AUG iniciante e um interno é clara. Em bactérias, os dois tipos separados de tRNA específicos para a metionina são designados como $tRNA^{Met}$ e $tRNA^{fMet}$. O resíduo de aminoácido, incorporado em resposta ao códon de iniciação (5′)AUG, é o *N*-formilmetionina (fMet). Ele chega ao ribossomo como *N*-formilmetionil-$tRNA^{fMet}$ (fMet-$tRNA^{fMet}$), o qual é formado em duas reações sucessivas. Primeiro, a metionina é ligada ao $tRNA^{fMet}$ pela Met-tRNA sintetase (que na *E. coli* aminoacila tanto o $tRNA^{fMet}$ quanto o $tRNA^{Met}$):

$$\text{Metionina} + \text{tRNA}^{\text{fMet}} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Met-tRNA}^{\text{fMet}} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Em seguida, a transformilase transfere um grupo formila do *N*-formiltetraidrofolato ao grupo amino do resíduo de Met:

$$N^{10}\text{-Formiltetraidrofolato} + \text{Met-tRNA}^{\text{fMet}} \longrightarrow \text{tetraidrofolato} + \text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$$

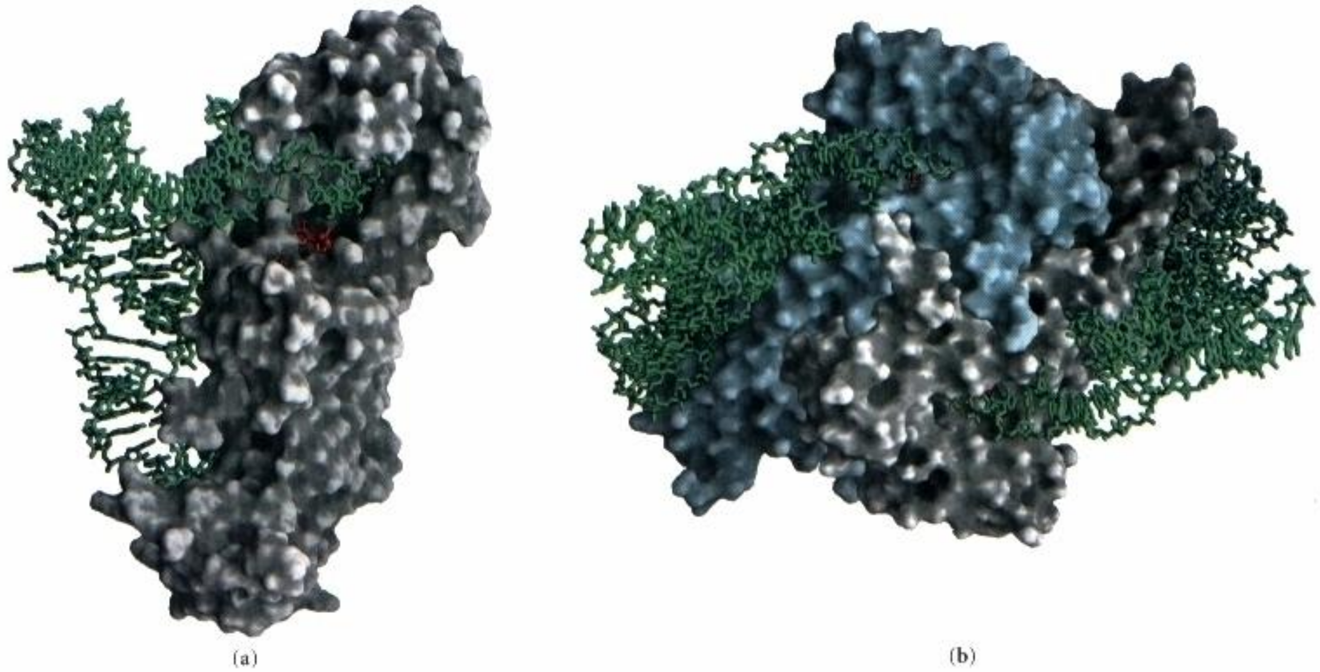


Figura 27-19 – Aminoacil-tRNA sintetases. Ambas as sintetases são complexadas com seus tRNAs de origem (estruturas em varetas verdes). O ATP ligado (em vermelho) aponta o sítio ativo, próximo à extremidade do braço aminoacila. (**a**) Essa Gln-tRNA sintetase da *E. coli* é uma sintetase monomérica, característica do tipo I. (**b**) A Asp-tRNA sintetase da levedura é uma sintetase dimérica, característica do tipo II.

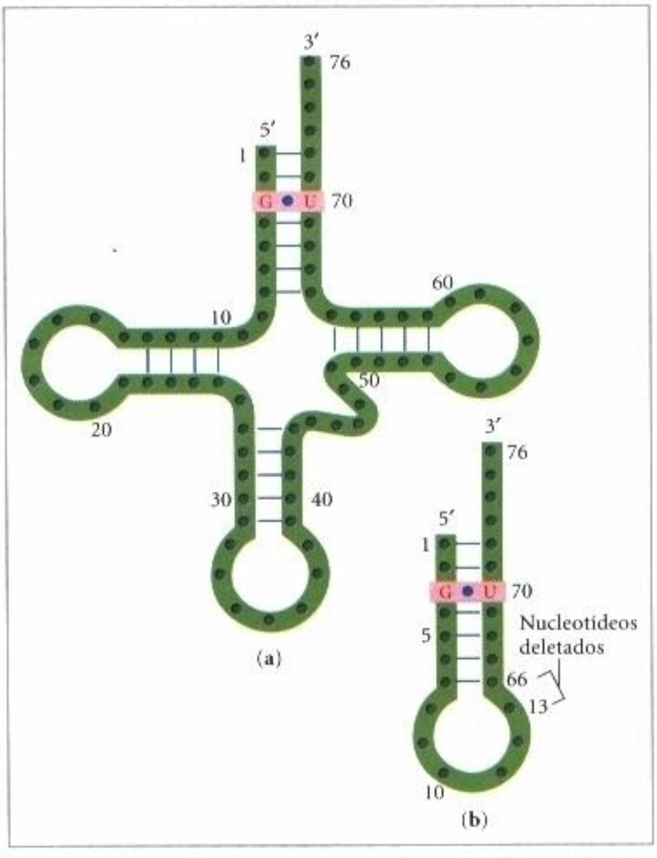


Figura 27-20 – (**a**) Os elementos estruturais do tRNA^{Ala} reconhecidos pela Ala-tRNA sintetase são incomumente simples. Um par de base G=U (em vermelho), sozinho, é o único elemento necessário para a ligação específica e a aminoacilação. (**b**) Uma mini-hélice de um RNA sintético curto, que tenha o par de base crítico G=U, mas não possua o restante da estrutura do tRNA, é especificamente aminoacilada com alanina, quase tão eficientemente quanto o tRNA^{Ala} completo.

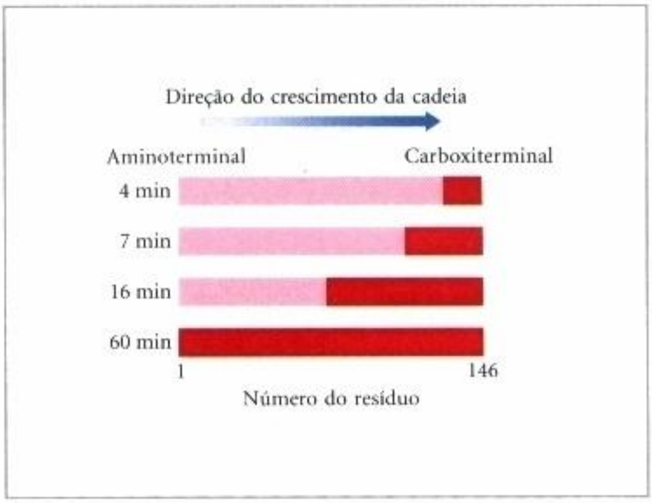
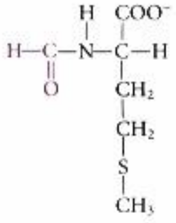


Figura 27-21 – Prova de que as cadeias polipeptídicas crescem até a extremidade carboxila pela adição de novos resíduos de aminoácidos — o experimento de Dintzis. Reticulócitos (eritrócitos imaturos) que sintetizam ativamente hemoglobina foram incubados com leucina radioativa (selecionada porque ela ocorre freqüentemente ao longo das cadeias α e β das globinas). Amostras de cadeias α completas foram isoladas dos reticulócitos em vários tempos após a adição da leucina radioativa, e a distribuição da radioatividade foi determinada. As zonas em vermelho-escuro mostram as porções das cadeias de α-globinas completas que contém resíduos de leucina radioativos. Aos 4 minutos, apenas alguns poucos resíduos na extremidade carboxila de uma α-globina foram marcados, porque apenas as cadeias de globina *completas* que continham marcação após 4 minutos eram aquelas que estavam próximas do final da síntese no instante em que o isótopo foi adicionado. Com tempos de incubação maiores, segmentos sucessivamente mais extensos da cadeia polipeptídica continham resíduos marcados, sempre mais distantes da extremidade carboxiterminal da cadeia. A extremidade não marcada do polipeptídeo (aminoterminal) foi, dessa forma, definida como a extremidade iniciadora; a cadeia polipeptídica cresce por adições sucessivas dos aminoácidos até a extremidade carboxila.

A transformilase é mais seletiva que a Met-tRNA sintetase; ela é específica para resíduos de Met ligados ao tRNA$^{\text{fMet}}$, presumivelmente reconhecendo alguma característica estrutural única daquele tRNA. Pelo contrário, a Met-tRNA$^{\text{Met}}$ insere a metionina nas posições internas nos polipeptídeos.

A adição do grupo *N*-formil ao grupo amino da metionina pela transformilase impede fMet de entrar em posições internas em um polipeptídeo, enquanto ainda permite que o fMet-tRNA$^{\text{fMet}}$ seja ligado a um sítio de iniciação específico no ribossomo, que não aceita nem Met-tRNA$^{\text{Met}}$ nem qualquer outro aminoacil-tRNA.

Nas células eucarióticas, todos os polipeptídeos sintetizados pelos ribossomos citosólicos começam com um resíduo de Met (em vez de fMet), mas, novamente, um tRNA de iniciação especializado é usado para distingui-lo do tRNA$^{\text{Met}}$ usado nos códons (5')AUG nas posições internas no mRNA. Polipeptídeos sintetizados pelos ribossomos nas mitocôndrias e nos cloroplastos, entretanto, começam com *N*-formilmetionina. Isso apóia fortemente o ponto de vista de que as mitocôndrias e os cloroplastos se originam de ancestrais bacterianos que foram simbioticamente incorporados aos precursores das células eucarióticas, em um estágio inicial da evolução (veja Fig. 2-15).



$$H-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\overset{H}{\overset{|}{N}}-\overset{COO^-}{\overset{|}{C}}-H$$
$$-CH_2-CH_2-S-CH_3$$

N-Formilmetionina

De que forma um único códon (5')AUG pode identificar tanto a *N*-formilmetionina (ou metionina, nos eucariotos) quanto aqueles resíduos de Met que ocorrem nas posições interiores dos polipeptídeos? A resposta torna-se clara na discussão seguinte.

As três etapas da iniciação. A iniciação da síntese polipeptídica nas bactérias requer (1) a subunidade ribossômica 30S, (2) o mRNA que codifica o polipeptídeo a ser sintetizado, (3) o fMet-tRNA$^{\text{fMet}}$ de iniciação, (4) um conjunto de três proteínas, chamado de fatores de iniciação (IF-1, IF-2 e IF-3), (5) GTP, (6) a subunidade ribossômica 50S, e (7) Mg^{2+}. A formação do complexo de iniciação realiza-se em três etapas (Fig. 27-22).

Na etapa ①, a subunidade ribossômica 30S liga-se a dois fatores de iniciação, IF-1 e IF-3. O IF-3 previne que as subunidades 30S e 50S se combinem prematuramente. O mRNA liga-se, então, à subunidade 30S. O (5')AUG de iniciação é guiado para sua posição correta, pela **seqüência Shine-Dalgarno** no mRNA. Essa seqüência consenso é um sinal de iniciação de quatro a nove resíduos purínicos, oito a 13 pares de bases no lado 5' do códon de iniciação (Fig. 27-23a). Ela pareia com uma seqüência complementar, rica em pirimidinas, próximo à extremidade 3' do 16S rRNA da subunidade ribossômica 30S (Fig. 27-23b). Essa interação mRNA-rRNA posiciona a seqüência iniciadora (5')AUG do mRNA na posição precisa da subunidade 30S, onde ela é requerida para a iniciação da tradução. O (5')AUG específico, em que se ligará o fMet-tRNA$^{\text{fMet}}$, é, portanto, distinguido de outros códons de metionina, por sua proximidade com a seqüência Shine-Dalgarno no mRNA.

Os ribossomos bacterianos possuem três sítios que ligam aminoacil-tRNAs, o **sítio A ou aminoacila**, o **sítio P ou peptidil**, e o **sítio E** ou **de saída** ("exit"). Ambas as subunidades 30S e 50S con-

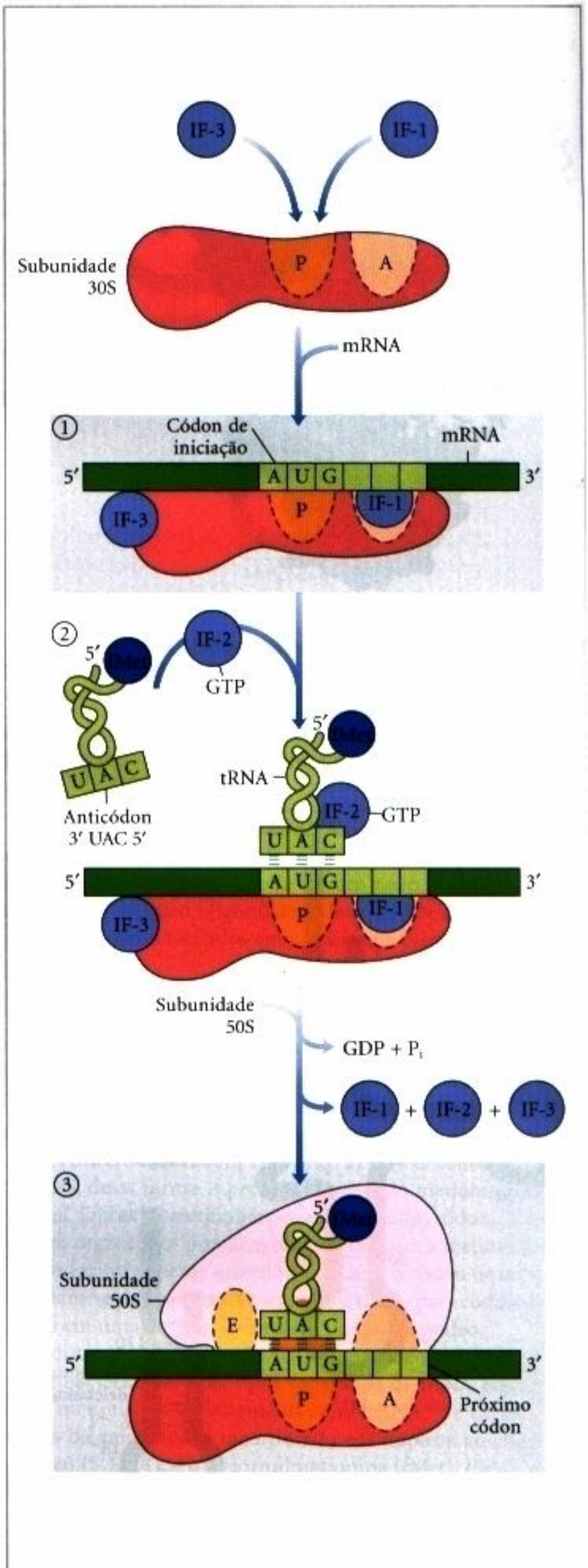


Figura 27-22 – Formação do complexo de iniciação. O complexo se forma em três etapas (descritas no texto), às expensas da hidrólise do GTP em GDP e P$_i$. IF-1, IF-2 e IF-3 são fatores de iniciação. P designa o sítio peptidil, A, o sítio aminoacila, e E, o sítio de saída ("exit"). Aqui, o anticódon do tRNA é orientado na direção 3' para 5', da esquerda para a direita, como na Figura 27-8, mas em oposição à orientação nas Figuras 27-18 e 27-10.

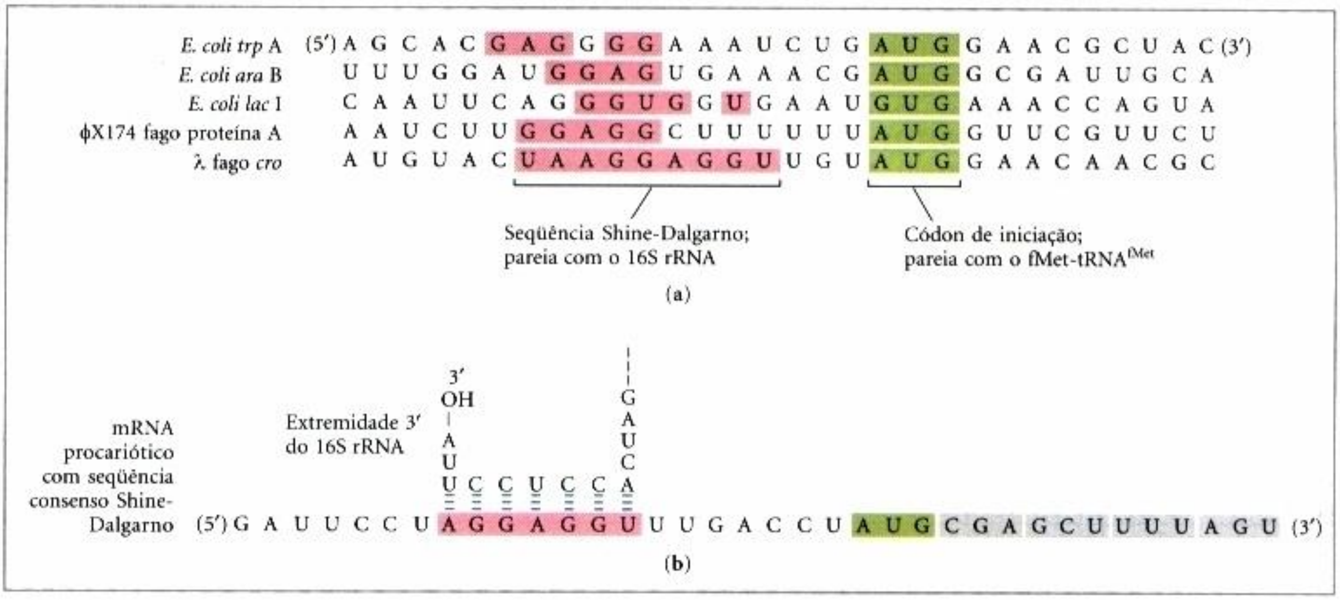

E. coli trp A (5′) A G C A C G A G G G G A A A U C U G A U G G A A C G C U A C (3′)
E. coli ara B U U U G G A U G G A G U G A A A C G A U G G C G A U U G C A
E. coli lac I C A A U U C A G G G U G G U G A A U G U G A A A C C A G U A
ϕX174 fago proteína A A A U C U U G G A G G C U U U U U U A U G G U U C G U U C U
λ fago cro A U G U A C U A A G G A G G U U G U A U G G A A C A A C G C
Seqüência Shine-Dalgarno; pareia com o 16S rRNA
Códon de iniciação; pareia com o fMet-tRNA^fMet
(a)
mRNA procariótico com seqüência consenso Shine-Dalgarno
Extremidade 3′ do 16S rRNA
3′ OH
A U U C C U C C A C U A G
(5′) G A U U C C U A G G A G G U U U G A C C U A U G C G A G C U U U U A G U (3′)
(b)

Figura 27-23 – Seqüências no mRNA, que funcionam como sinais para a iniciação da síntese de proteínas nas bactérias. (**a**) O alinhamento do AUG de iniciação (sombreado em verde) na sua correta localização na subunidade 30S depende, em parte, das seqüências Shine-Dalgarno (sombreadas em vermelho) a montante. Porções de transcritos de mRNA de cinco genes procarióticos são mostradas. (**b**) As seqüências Shine-Dalgarno pareiam com uma seqüência próxima da extremidade 3′ do rRNA 16S.

tribuem para as características dos sítios A e P, enquanto o sítio E é largamente confinado à subunidade 50S. O (5′)AUG iniciador é posicionado no sítio P, que é o único sítio ao qual o fMet-tRNA^{fMet} pode se ligar (Fig. 27-22). O fMet-tRNA^{fMet} é o único aminoacil-tRNA que se liga primeiro ao sítio P; durante as etapas de alongamento subseqüentes, todos os outros aminoacil-tRNA que chegam (incluindo o Met-tRNA^{Met}, que se liga aos AUG interiores) se ligam primeiro ao sítio A e apenas subseqüentemente aos sítios P e E. O sítio E é o sítio do qual os tRNA "descarregados" saem durante o alongamento. O fator de iniciação IF-1 se liga ao sítio A e impede a ligação do tRNA nesse sítio durante a iniciação.

Na etapa ② do processo de iniciação (Fig. 27-22), o complexo que consiste da subunidade 30S, IF-3 e mRNA é unido tanto pelo IF-2 ligado ao GTP como pelo fMet-tRNA^{fMet} de iniciação. O anticódon desse tRNA pareia, agora corretamente, com o códon de iniciação do mRNA.

Na etapa ③, esse grande complexo se combina com a subunidade ribossômica 50S; simultaneamente, a molécula do GTP, ligada ao IF-2, é hidrolisada a GDP e P$_i$, que são liberados do complexo. Todos os três fatores de iniciação se separam do ribossomo nesse ponto.

A finalização das etapas na Figura 27-22 produz um ribossomo funcional 70S, chamado de **complexo de iniciação**, que contém o mRNA e o fMet-tRNA^{fMet} de iniciação. A ligação correta do fMet-tRNA^{fMet} ao sítio P no complexo completo de iniciação 70S é garantida por, pelo menos, três pontos de reconhecimento e ligação: a interação códon-anticódon, que envolve o AUG de iniciação fixado no sítio P; a interação entre a seqüência Shine-Dalgarno no mRNA e o rRNA 16S; e as interações de ligação entre o sítio ribossômico P e o fMet-tRNA^{fMet}. O complexo de iniciação está, agora, pronto para as etapas de alongamento.

Iniciação nas células eucarióticas. A tradução eucariótica é geralmente semelhante à tradução nas células bacterianas, com a maioria das diferenças significativas aparecendo no mecanismo de iniciação. Os mRNA eucarióticos são ligados ao ribossomo como um complexo com várias proteínas de ligação específicas. Acredita-se que algumas delas mantenham juntas as extremidades 5′ e 3′ da mensagem. Na extremidade 3′, o mRNA é ligado por uma proteína chamada de proteína de ligação ao poli(A) (PAB — "*p*oly(*A*) *b*inding protein"). As células eucarióticas possuem, pelo menos, nove fatores de iniciação. Um complexo chamado de eIF4F, que inclui as proteínas eIF4E, eIF4G e eIF4A, liga-se ao capacete 5′, por meio do eIF4E. A proteína eIF4G liga-se tanto ao eIF4E quanto ao PAB, mantendo-os efetivamente juntos (Fig. 27-24). A proteína eIF4A possui uma atividade RNA helicase. É o complexo eIF4F que se associa com um outro fator, eIF3, e com a subunidade ribossômica 40S. A eficiência da tradução é afetada por muitas propriedades do mRNA e proteínas nesse complexo, incluindo a extensão da cauda 3′ poli(A) (na maioria dos casos, mais longa é melhor). Os arranjos extremidade-extremidade facilitam a regulação traducional da expressão gênica pelos mecanismos que consideraremos no próximo capítulo.

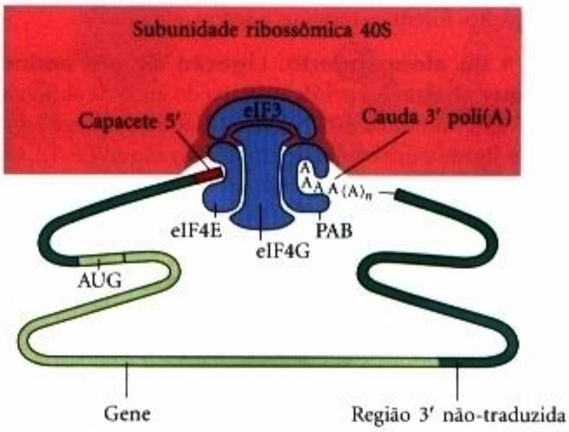

Subunidade ribossômica 40S
eIF3
Capacete 5′
Cauda 3′ poli(A)
A A A A (A)$_n$
eIF4E
PAB
eIF4G
AUG
Gene
Região 3′ não-traduzida

Figura 27-24 – Complexos de proteínas na formação de um complexo de iniciação eucariótico. As extremidades 3′ e 5′ do mRNA eucariótico são ligadas por um complexo de proteínas, que inclui vários fatores de iniciação e a proteína de ligação poli(A) (PAB). Os fatores eIF4E e eIF4G são parte de um complexo maior, chamado de eIF4F. Esse complexo liga-se à subunidade ribossômica 40S.

Tabela 27-9 – Fatores protéicos requeridos para a iniciação da tradução em células bacterianas e eucarióticas

Bacteriana	
Fator	**Função**
IF-1	Impede a ligação prematura de tRNAs ao sítio A
IF-2	Facilita a ligação do fMet-tRNA^{fMet} à subunidade ribossômica 30S
IF-3	Liga-se à subunidade 30S; impede a associação prematura da subunidade 50S; aumenta a especificidade do sítio P para o fMet-tRNAf^{Met}
Eucariótica	
Fator*	**Função**
eIF2	Facilita a ligação do Met-tRNA^{Met} de iniciação à subunidade ribossômica 40S
eIF2B, eIF3	Primeiros fatores a se ligarem à subunidade 40S; facilitam as etapas subseqüentes
eIF4A	A atividade RNA helicase remove a estrutura secundária do RNA no mRNA para permitir a ligação à subunidade 40S; parte do complexo e IF4F
eIF4B	Liga-se ao mRNA; facilita o rastreamento do mRNA para localizar o primeiro AUG
eIF4E	Liga-se ao capacete 5′ do mRNA; parte do complexo eIF4F
eIF4G	Liga-se ao eIF4E e à proteína de ligação poli(A) (PAB); parte do complexo eIF4F
eIF5	Promove a dissociação de vários outros fatores de iniciação da subunidade 40S como preliminar à associação da subunidade 60S, para formar o complexo de iniciação 80S
eIF6	Facilita a dissociação do ribossomo 80S inativo nas subunidades 40S e 60S

*O prefixo "e" identifica os fatores eucarióticos.

O (5')AUG de iniciação está localizado dentro do mRNA, não por sua proximidade a uma seqüência semelhante à Shine-Dalgarno, mas por um rastreamento do mRNA, a partir da extremidade 5′ e até que o primeiro AUG seja encontrado, sinalizando o início da janela de leitura. O complexo eIF4F está provavelmente envolvido no processo de rastreamento, talvez usando a atividade RNA helicase do eIF4A para eliminar a estrutura secundária na porção 5′ não traduzida do mRNA. O rastreamento é facilitado por uma outra proteína, a eIF4B.

Os papéis dos vários fatores de iniciação bacterianos e eucarióticos, em todo o processo, estão resumidos na Tabela 27-9. O mecanismo pelo qual essas proteínas agem continua sendo uma área importante de investigação.

Etapa 3: As ligações peptídicas são formadas na etapa de alongamento

A terceira etapa da síntese de proteínas é o **alongamento**. Novamente, o nosso foco inicial é dirigido às células bacterianas. O alongamento requer (1) o complexo de iniciação descrito anteriormente, (2) aminoacil-tRNAs, (3) um conjunto de três proteínas citosólicas solúveis, chamadas de **fatores de alongamento** (EF-Tu, EF-Ts e EF-G nas bactérias), e (4) GTP. As três etapas são necessárias para adicionar cada resíduo de aminoácido, e elas são repetidas tantas vezes quantos forem os resíduos a serem adicionados.

Etapa 1 do alongamento: Ligação de um aminoacil-tRNA que chega. Na primeira etapa do ciclo de alongamento (Fig. 27-25), o aminoacil-tRNA apropriado que chega é, primeiramente, ligado a um complexo do GTP ligado ao EF-Tu. O complexo resultante aminoacil-tRNA–EF-Tu•GTP liga-se ao sítio A do complexo de iniciação 70S. O GTP é hidrolisado e um complexo EF-Tu•GDP é liberado do ribossomo 70S. O complexo EF-Tu•GTP é regenerado em um processo que envolve EF-Ts e GTP.

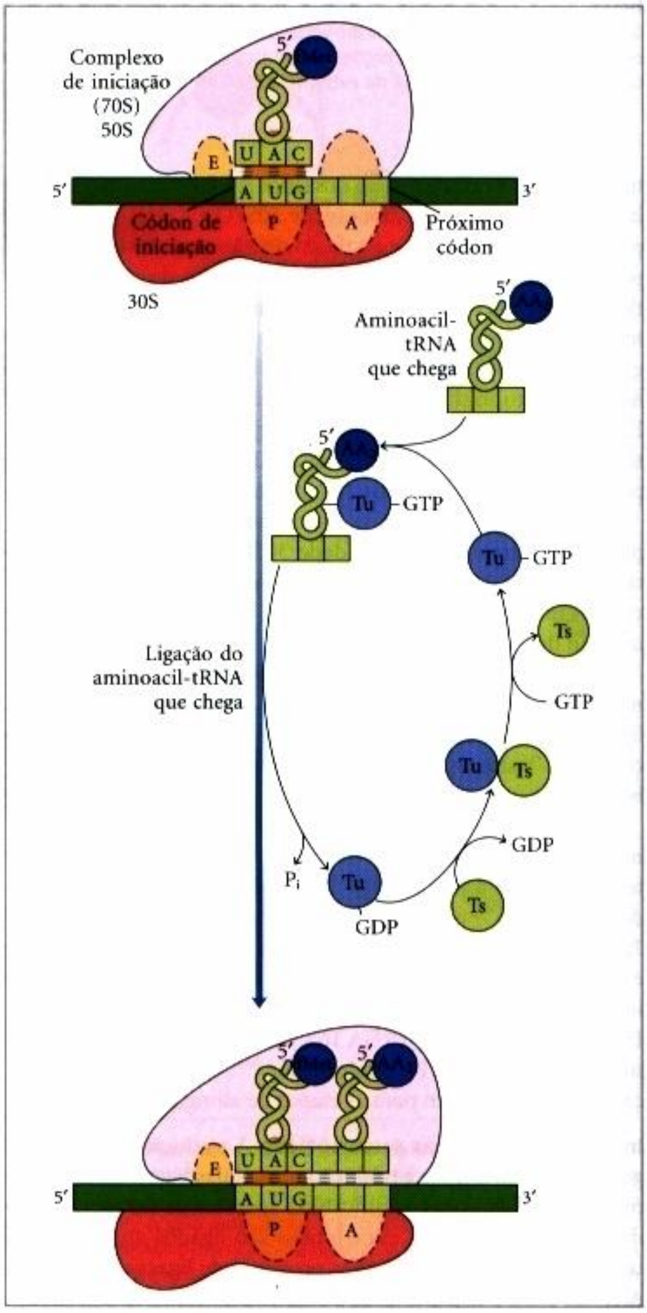


Figura 27-25 – Primeira etapa no alongamento (bactérias): a ligação do segundo aminoacil-tRNA. O segundo aminoacil-tRNA entra no sítio A do ribossomo ligado ao EF-Tu (mostrado aqui como Tu), que também contém GTP. A ligação do segundo aminoacil-tRNA ao sítio A no ribossomo é acompanhada pela hidrólise do GTP em GDP e P$_i$ e pela liberação do complexo EF-Tu•GDP do ribossomo. O GDP ligado é liberado quando o complexo EF-Tu•GDP liga-se ao EF-Ts, e o EF-Ts é subseqüentemente liberado quando uma outra molécula de GTP torna-se ligada ao EF-Tu. Isso recicla o EF-Tu e torna-o disponível para repetir o ciclo.

Etapa 2 do alongamento: Formação da ligação peptídica. Uma ligação peptídica é agora formada entre os dois aminoácidos que ainda estão ligados por seus tRNAs aos sítios A e P no ribossomo. Isso ocorre pela transferência do grupo *N*-formilmetionil do seu tRNA de iniciação ao grupo amino do segundo aminoácido, agora no sítio A (Fig. 27-26). O grupo α-amino do aminoácido no sítio A age como um nucleofílico, deslocando o tRNA do sítio P para formar a ligação peptídica. Essa reação produz um dipeptidil-tRNA no sítio A, e o agora tRNA^{fMet} "descarregado" (deacilado) permanece ligado ao sítio P. Os tRNAs, então, deslocam-se para um estado de ligação híbrida, com elementos de cada um atravessando dois sítios diferentes no ribossomo, como mostrado na Figura 27-26.

A atividade enzimática que catalisa a formação da ligação peptídica tem sido historicamente chamada de **peptidil transferase** e era largamente assumida como intrínseca a uma ou mais proteínas da subunidade ribossômica maior. Essa reação pode, de fato, ser catalisada pelo rRNA 23S, possivelmente adicionando-a ao conhecido repertório catalítico das ribozimas.

Etapa 3 do alongamento: Translocação. Na etapa final do ciclo de alongamento, a **translocação**, o ribossomo move um códon em direção à extremidade 3′ do mRNA (Fig. 27-27). Esse movimento desloca o anticódon do dipeptidil-tRNA, que ainda está ligado ao segundo códon do mRNA, do sítio A para o sítio P, e desloca o tRNA deacilado do sítio P para o sítio E. O tRNA é

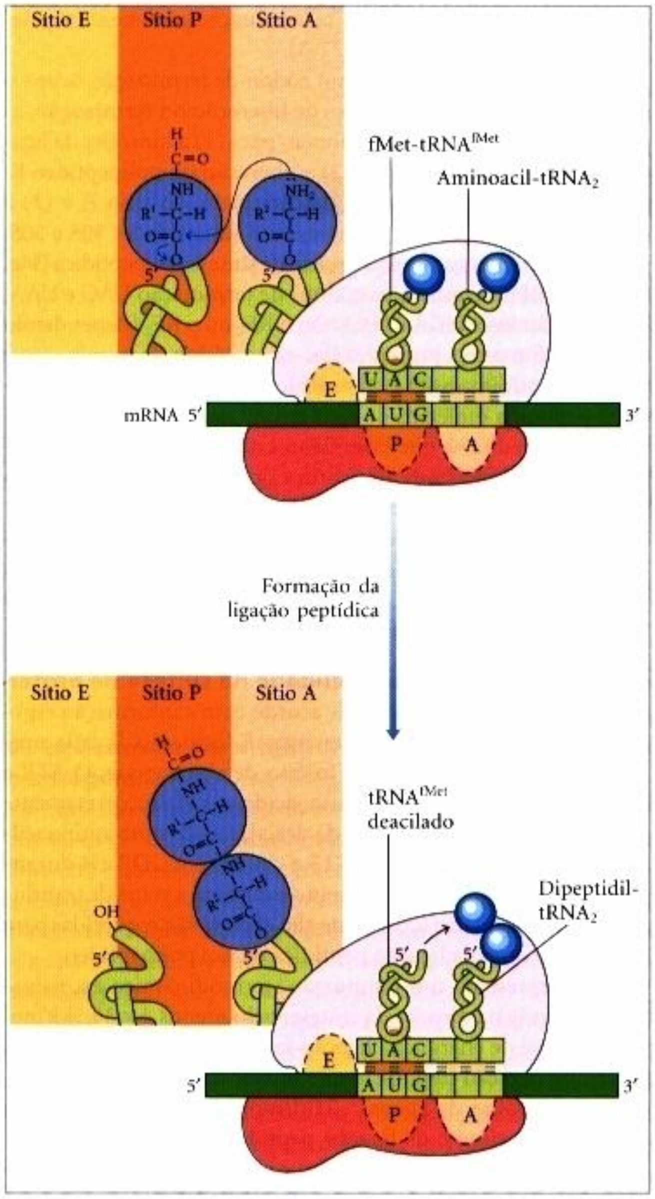

Sítio E
Sítio P
Sítio A
fMet-tRNA^{fMet}
Aminoacil-tRNA$_2$
H
C=O
NH
NH$_2$
R^1–C–H
R^2–C–H
O=C
O
5′
E
UAC
AUG
mRNA 5′
3′
P
A
Formação da ligação peptídica
tRNA^{fMet} deacilado
Dipeptidil-tRNA$_2$
OH

Figura 27-26 – Segunda etapa no alongamento (bactérias): formação da primeira ligação peptídica. A peptidil transferase que catalisa essa reação é, provavelmente, a ribozima rRNA 23S. O grupo *N*-formilmetionil é transferido para o grupo amino do segundo aminoacil-tRNA no sítio A, formando o dipeptidil-tRNA. Nessa etapa, ambos os tRNAs ligados ao ribossomo deslocam-se de posição na subunidade 50S para adotar um estado de ligação híbrido. O tRNA descarregado se desloca de forma que suas extremidades 3′ e 5′ estejam no sítio E. Semelhantemente, as extremidades 3′ e 5′ do peptidil-tRNA se deslocam para o sítio P. Os anticódons permanecem nos sítios A e P.

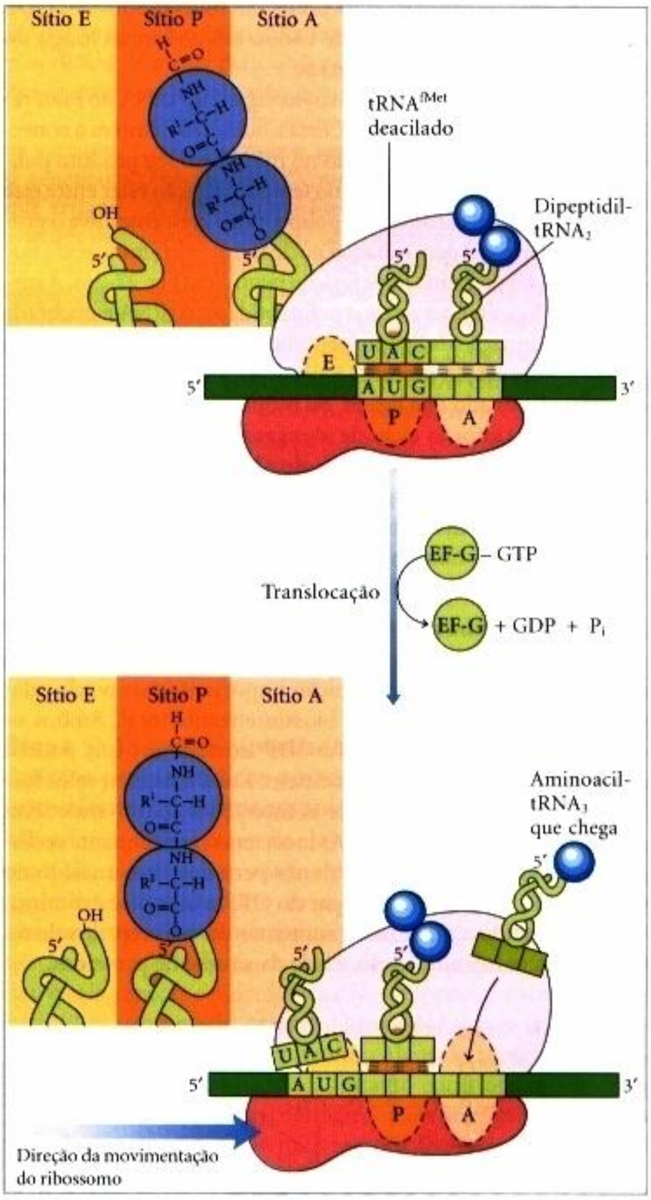

Sítio E
Sítio P
Sítio A
H
C=O
NH
R^1–C–H
R^2–C–H
O=C
OH
tRNA^{fMet} deacilado
Dipeptidil-tRNA$_2$
5′
E
UAC
AUG
3′
P
A
EF-G – GTP
Translocação
EF-G + GDP + P$_i$
Aminoacil-tRNA$_3$ que chega
Direção da movimentação do ribossomo

Figura 27-27 – Terceira etapa no alongamento (bactérias): translocação. O ribossomo move um códon na direção da extremidade 3′ do mRNA, usando a energia fornecida pela hidrólise do GTP ligado ao EF-G (translocase). O dipeptidil-tRNA está, agora, inteiramente no sítio P, deixando o sítio A aberto para o aminoacil-tRNA que chega (terceiro). O tRNA descarregado se dissocia do sítio E, e o ciclo de alongamento começa novamente.

então liberado do sítio E para o citosol. O terceiro códon do mRNA agora está no sítio A e o segundo códon no sítio P. O movimento do ribossomo ao longo do mRNA requer EF-G (também chamada de translocase) e a energia fornecida pela hidrólise de uma outra molécula do GTP. Uma mudança na conformação tridimensional do ribossomo inteiro capacita a sua movimentação ao longo do mRNA. A estrutura do EF-G mimetiza a estrutura do complexo EF-Tu/tRNA (veja pág. 805), sugerindo que o EF-G pode se ligar ao sítio A e deslocar o peptidil-tRNA.

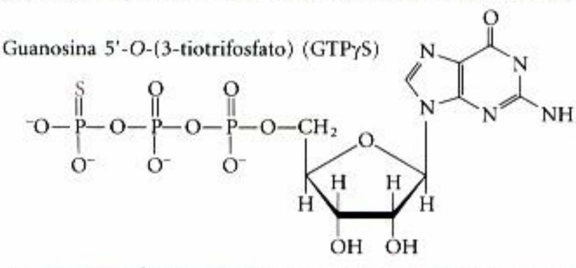
O ribossomo, com os seus dipeptidil-tRNA e mRNA ligados, está pronto agora para o próximo ciclo de alongamento e para a ligação de um terceiro resíduo de aminoácido. Esse processo ocorre precisamente do mesmo modo como foi a adição do segundo resíduo (como mostrado nas Figs. 27-25, 27-26 e 27-27). Para cada resíduo de aminoácido adicionado ao polipeptídeo em crescimento, dois GTPs são hidrolisados em GDP e P_i, e o ribossomo move-se de códon em códon ao longo do mRNA, na direção da extremidade 3′.

A cadeia polipeptídica permanece ligada ao tRNA do mais recente aminoácido a ser inserido. Essa associação mantém a conecção funcional entre a informação no mRNA e o seu produto polipeptídeo decodificado. Ao mesmo tempo, a ligação éster entre esse tRNA e o terminal carboxila do polipeptídeo crescente ativa o grupo carboxiterminal para o ataque nucleofílico pelo aminoácido que chega, para formar uma nova ligação peptídica (Fig. 27-26). À medida que a ligação éster entre o polipeptídeo e o tRNA é quebrada durante a formação da ligação peptídica, a ligação entre o polipeptídeo e a informação no mRNA persiste, porque cada novo aminoácido adicionado está ligado, ele próprio, ao seu tRNA.

Nos eucariotos, o ciclo de alongamento é bem semelhante ao dos procariotos. Três fatores de alongamento eucarióticos (eEF1α, eEF1βγ, e eEF2) possuem funções análogas àquelas dos fatores de alongamento bacterianos EF-Tu, EF-Ts e EF-G, respectivamente. Os ribossomos eucarióticos não possuem um sítio E. tRNAs descarregados são expelidos diretamente do sítio P.

A revisão no ribossomo. A atividade GTPase do EF-Tu, durante a primeira etapa do alongamento nas células bacterianas (Fig. 27-25), cria uma contribuição importante para a velocidade e a fidelidade do processo biossintetizante total. Ambos os complexos EF-Tu•GTP e EF-Tu•GDP existem por uns poucos milissegundos, antes que se dissociem. Esses dois intervalos fornecem oportunidades para que as interações códon-anticódon sejam revistas. Aminoacil-tRNAs incorretos normalmente se dissociam do sítio A durante um desses períodos. Se o análogo do GTP, o GTPγS, for usado no lugar do GTP, a hidrólise é diminuída, melhorando a fidelidade (aumentando os intervalos de revisão), mas reduzindo a velocidade da síntese de proteínas.

Guanosina 5'-*O*-(3-tiotrifosfato) (GTPγS)



O processo da síntese de proteínas (incluindo as características do pareamento códon-anticódon já descritas) foi claramente otimizado através da evolução para balancear os requerimentos, tanto da velocidade quanto da fidelidade. A melhoria da fidelidade poderia diminuir a velocidade, enquanto o aumento na velocidade poderia comprometer a fidelidade. Observe que o mecanismo de revisão no ribossomo estabelece apenas que o pareamento códon-anticódon apropriado se realizou. A identidade dos aminoácidos ligados aos tRNAs não é verificada nos ribossomos. Se um tRNA for aminoacilado com o aminoácido errado (como pode ser feito experimentalmente), esse aminoácido incorreto é eficientemente incorporado em uma proteína, em resposta a qualquer códon que seja normalmente reconhecido pelo tRNA.

Etapa 4: A terminação da síntese polipeptídica requer um sinal especial

O alongamento continua até que o ribossomo adicione o último aminoácido codificado pelo mRNA. A terminação, a quarta etapa da síntese de proteínas, é sinalizada pela presença de um dos três códons de terminação no mRNA (UAA, UAG, UGA), que se segue imediatamente ao último de aminoácido codoficado. Mutações em um anticódon tRNA que permitam que um aminoácido seja inserido em um códon de terminação geralmente são deletérias para a célula (Adendo 27-3).

Nas bactérias, assim que um códon de terminação ocupa o sítio ribossômico A, três **fatores de liberação** ou **terminação**, as proteínas RF_1, RF_2 e RF_3 contribuem para (1) a hidrólise da ligação peptidil-tRNA terminal, (2) a liberação do polipeptídeo livre e do último tRNA, agora descarregado, do sítio P, e (3) a dissociação do ribossomo 70S nas suas subunidades 30S e 50S, prontas para começar um novo ciclo de síntese polipeptídica (Fig. 27-28). O RF_1 reconhece os códons de terminação UAG e UAA, e o RF_2 reconhece UGA e UAA. Ou o RF_1 ou o RF_2 (dependendo de que códon esteja presente) liga-se ao códon de terminação e induz a peptidiltransferase a transferir a cadeia peptídica crescente para uma molécula de água em vez de para um outro aminoácido. Acredita-se que esses fatores de liberação possuam domínios que mimetizam a estrutura do tRNA, como mostrado para o fator de alongamento ED-G, na pág. 805. A função específica do RF_3 não foi firmemente estabelecida, embora se acredite que ele libere a subunidade ribossômica. Nos eucariotos, um único fator de liberação, chamado de eRF, reconhece todos os três códons de terminação.

O custo energético da fidelidade na síntese de proteínas. Sintetizar uma proteína de acordo com a informação especificada em seu mRNA requer energia. A formação de cada aminoacil-tRNA usa dois grupos fosfato de alta energia. O ATP é consumido cada vez que um aminoácido ativado incorretamente for hidrolisado pela atividade de deacilação de uma aminoacil-tRNA sintetase (pág. 819). O GTP é clivado em GDP e P_i durante a primeira etapa de alongamento e durante a etapa de translocação. Mais de quatro ligações de alta energia são requeridas para a formação de cada ligação peptídica de um polipeptídeo.

Isso representa um "empurrão" termodinâmico excessivamente grande na direção da síntese: pelo menos 4 × 30,5kJ/mol = 122kJ/mol de energia na ligação fosfodiéster é requerida para gerar uma ligação peptídica, que possui uma energia livre padrão de hidrólise de apenas –21kJ/mol. A variação de energia livre total na síntese da ligação peptídica é, portanto, –101kJ/mol. As proteínas são polímeros que contêm informação. O objetivo bioquímico não é apenas a formação de uma ligação peptídica, mas a formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos *específicos*. Cada uma das ligações de alta energia, gastas nesse processo, desempenha um papel crítico na manutenção do alinhamento apropriado entre cada novo códon no mRNA e o aminoácido que ele codifica na extremidade crescente do polipeptídeo. Essa energia torna possível uma grande fidelidade na tradução biológica da mensagem genética do mRNA na seqüência de aminoácidos das proteínas.

Adendo 27-3 Variação induzida no código genético: supressão sem sentido

Quando uma mutação introduz um códon de terminação no interior de um gene, a tradução é prematuramente interrompida e a cadeia polipeptídica incompleta é usualmente inativa. Essas são chamadas de mutações sem sentido. O gene pode ser restaurado à sua função normal, se uma segunda mutação (1) converter o códon de terminação mal colocado para um códon que especifique um aminoácido ou (2) suprimir os efeitos do códon de terminação. Tais mutações restauradoras são chamadas de **supressores sem sentido**; elas geralmente envolvem mutações nos genes de tRNA que produzem tRNAs alterados (supressores), os quais podem reconhecer o códon de terminação e inserir um aminoácido naquela posição. A maioria dos tRNAs supressores conhecidos possui substituições de uma única base em seus anticódons.

Os tRNAs supressores constituem uma variação induzida experimentalmente no código genético, para permitir a leitura do que usualmente seriam códons de terminação, semelhante às variações do código de ocorrência natural descritas no Adendo 27-2. A supressão sem sentido não interrompe completamente a transferência normal da informação na célula, porque ela usualmente possui várias cópias de cada gene de tRNA; alguns desses genes duplicados são fracamente expressos e constituem, apenas, uma pequena parte do reservatório celular de um tRNA particular. Mutações supressoras usualmente envolvem um tRNA "secundário", deixando o tRNA principal para ler os seus códons normalmente.

Por exemplo, a *E. coli* possui três genes idênticos para o $tRNA^{Tyr}$, cada um produzindo um tRNA com o anticódon (5')GUA. Um desses genes é expresso em níveis relativamente altos e, portanto, seu produto representa a espécie $tRNA^{Tyr}$ principal; os outros dois genes são transcritos apenas em pequenas quantidades. Uma alteração no anticódon do tRNA de um desses genes $tRNA^{Tyr}$ duplicados, de (5')GUA a (5')CUA, produz uma espécie de $tRNA^{Tyr}$ secundário, que inserirá tirosina nos códons de terminação UAG. Essa inserção da tirosina em UAG é realizada ineficientemente, mas pode permitir a produção apenas suficiente de uma proteína inteira útil, a partir de um gene com uma mutação sem sentido para permitir que a célula sobreviva. O $tRNA^{Tyr}$ principal continua a traduzir o código genético normalmente para a maioria das proteínas.

A mutação que leva à criação de um tRNA supressor nem sempre ocorre no anticódon. A supressão dos códons sem sentido UGA geralmente envolve o $tRNA^{Tyr}$, que normalmente reconhece UGG. A alteração que lhe permite ler UGA (e inserir Trp nessas posições) não ocorre no anticódon. Em vez disso, uma alteração G para A na posição 24 (em um braço do tRNA de alguma forma removido do anticódon) altera o tRNA de forma tal que ele possa ler *tanto* UGG *como* UGA. Uma alteração semelhante é encontrada nos tRNAs envolvidos nas variações de ocorrência natural mais comuns no código genético (UGA = Trp; veja Adendo 27-2).

A supressão deveria levar a muitas proteínas anormalmente longas, mas isso nem sempre ocorre. Ainda não entendemos muitos detalhes dos eventos moleculares que ocorrem durante a terminação da tradução e da supressão sem sentido.

Os polissomos permitem a tradução rápida de uma mensagem única. Grandes agregados de 10 até 100 ribossomos que são muito ativos na síntese protéica podem ser isolados tanto de células eucarióticas quanto de bacterianas. Uma fibra entre ribossomos adjacentes no agregado (chamado de um polissomo) é visível em eletromicrografias (Fig. 27-29). A fita conectante é uma única molécula de mRNA, sendo traduzida simultaneamente por muitos ribossomos cuidadosamente espaçados, permitindo o uso altamente eficiente do mRNA.

Nas bactérias, a transcrição e a tradução estão fortemente acopladas. RNAs mensageiros são sintetizados e traduzidos na mesma direção 5'→3'. Os ribossomos começam a traduzir a extremidade 5' do mRNA, antes que a transcrição esteja completa (Fig. 27-30). A situação é bem diferente nos eucariotos, em que os mRNAs recém-transcritos devem ser transferidos para fora do núcleo, antes que eles possam ser traduzidos.

Os mRNAs bacterianos geralmente existem por apenas alguns minutos (pág. 791), antes de ser degradados por nucleases. A fim de manter altas taxas da síntese de proteínas, o mRNA de uma certa proteína, ou conjunto de proteínas, deve ser sintetizado continuamente e traduzido com a máxima eficiência. O curto tempo de vida dos mRNAs nas bactérias permite que a síntese de uma proteína cesse rapidamente quando ela não for mais necessária para a célula.

Etapa 5: As recém-sintetizadas cadeias polipeptídicas sofrem enovelamento e processamento

Na quinta e última etapa da síntese de proteínas, a cadeia polipeptídica nascente é enrolada e processada na sua forma biologicamente ativa. Durante ou após sua síntese, o polipeptídeo assume progressivamente a sua conformação nativa, com a formação apropriada das pontes de hidrogênio e das interações van der Waals, iônicas e hidrofóbicas. Dessa forma, a mensagem genética linear ou unidimensional do mRNA é convertida na estrutura tridimensional da proteína. Algumas proteínas recém-sintetizadas, tanto procarióticas quanto eucarióticas, não atingem sua conformação final biologicamente ativa, até que tenham sido alteradas por uma ou mais reações de processamento, chamadas de **modificações pós-traducionais**.

Modificações nos grupos amino e carboxiterminais. Inicialmente, todos os polipeptídeos começam com um resíduo *N*-formilmetionina (na bactéria) ou metionina (nos eucariotos). Entretanto, o grupo formila, o resíduo aminoterminal Met e, freqüentemente, resíduos aminoterminal adicionais (e, em alguns casos, carboxiterminal) podem ser removidos enzimaticamente e, dessa forma, não aparecerem nas proteínas funcionais finais. Em aproximadamente 50% das proteínas eucarióticas, o

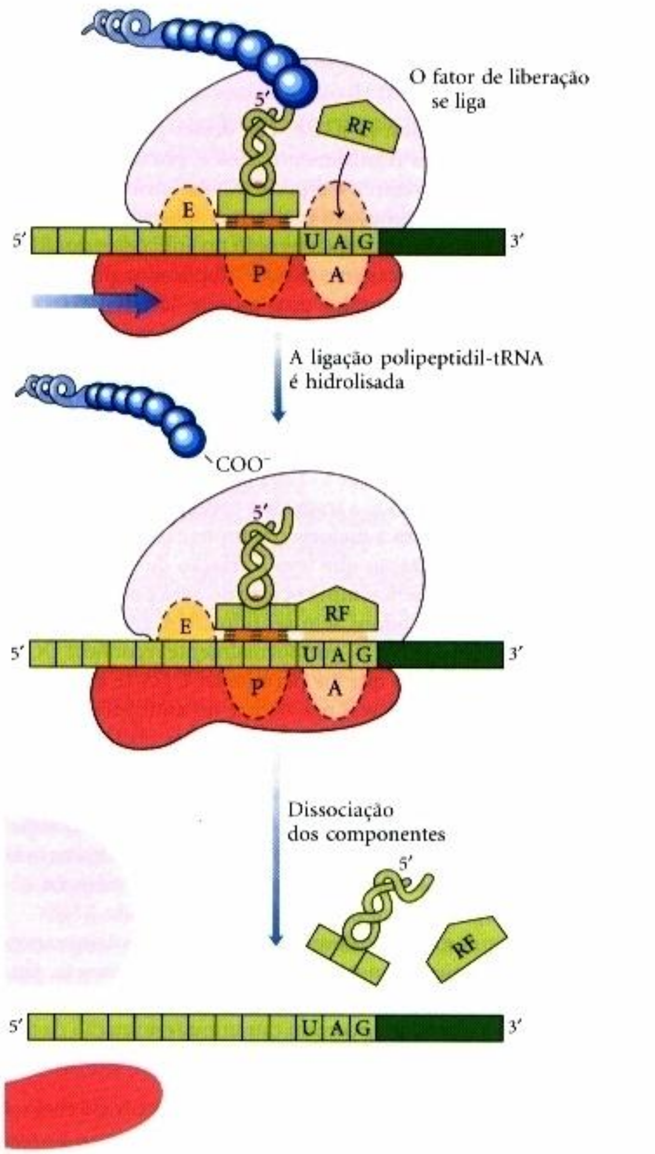

O fator de liberação se liga
5'
RF
E
P
A
U A G
5'
3'
A ligação polipeptidil-tRNA é hidrolisada
COO⁻
5'
RF
E
P
A
U A G
5'
3'
Dissociação dos componentes
5'
RF
5'
U A G
3'

Figura 27-28 – A terminação da síntese das proteínas nas bactérias. A terminação ocorre em resposta a um códon de terminação no sítio A. Primeiro, um fator de liberação (RF_1 ou RF_2, dependendo de que códon de terminação esteja presente) liga-se ao sítio A. Isso leva à hidrólise da ligação éster, entre o polipeptídeo nascente e o tRNA no sítio P, e à liberação do polipeptídeo completado. Finalmente, o mRNA, o tRNA deacilado e o fator de liberação deixam o ribossomo, e este se dissocia nas suas subunidades 30S e 50S.

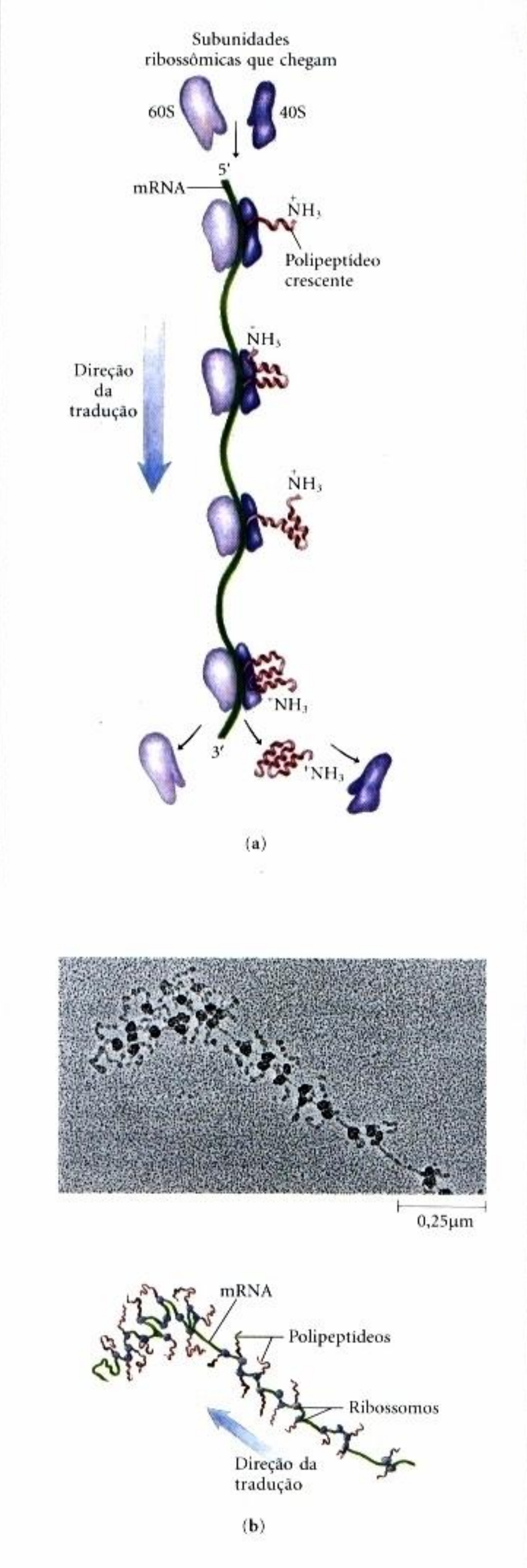

Subunidades ribossômicas que chegam
60S
40S
5'
mRNA
NH₃
Polipeptídeo crescente
Direção da tradução
NH₃
NH₃
NH₃
3'
NH₃
(a)
0,25μm
mRNA
Polipeptídeos
Ribossomos
Direção da tradução
(b)

Figura 27-29 – Um polissomo. (**a**) Quatro ribossomos são vistos traduzindo simultaneamente uma molécula de mRNA eucariótico, movendo-se da extremidade 5' para a extremidade 3', e sintetizando um polipeptídeo a partir do aminoterminal até o carboxiterminal. (**b**) Eletromicrografia e diagrama explicativo de um polissomo da glândula sedosa de uma larva do bicho-da-seda. O mRNA está sendo traduzido por muitos ribossomos, simultaneamente. Os polipeptídeos nascentes tornam-se maiores, à medida que os ribossomos movem-se para a extremidade 3' do mRNA. O produto final desse processo é a fibroína da seda.

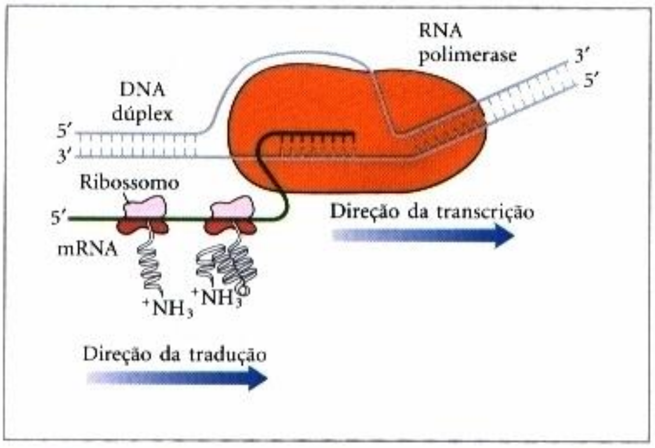


Figura 27-30 – O acoplamento da transcrição e da tradução nas bactérias. O mRNA é traduzido pelos ribossomos enquanto ele ainda está sendo transcrito do DNA pela RNA polimerase. Isso é possível porque o mRNA nas bactérias não tem que ser transportado do núcleo para o citoplasma antes de encontrar os ribossomos. Neste diagrama esquemático, os ribossomos são desenhados em tamanho menor do que a RNA polimerase. Na realidade, os ribossomos (M_r 2,7 × 10^6) são uma ordem de grandeza maior do que a RNA polimerase (M_r 3,9 × 10^5).

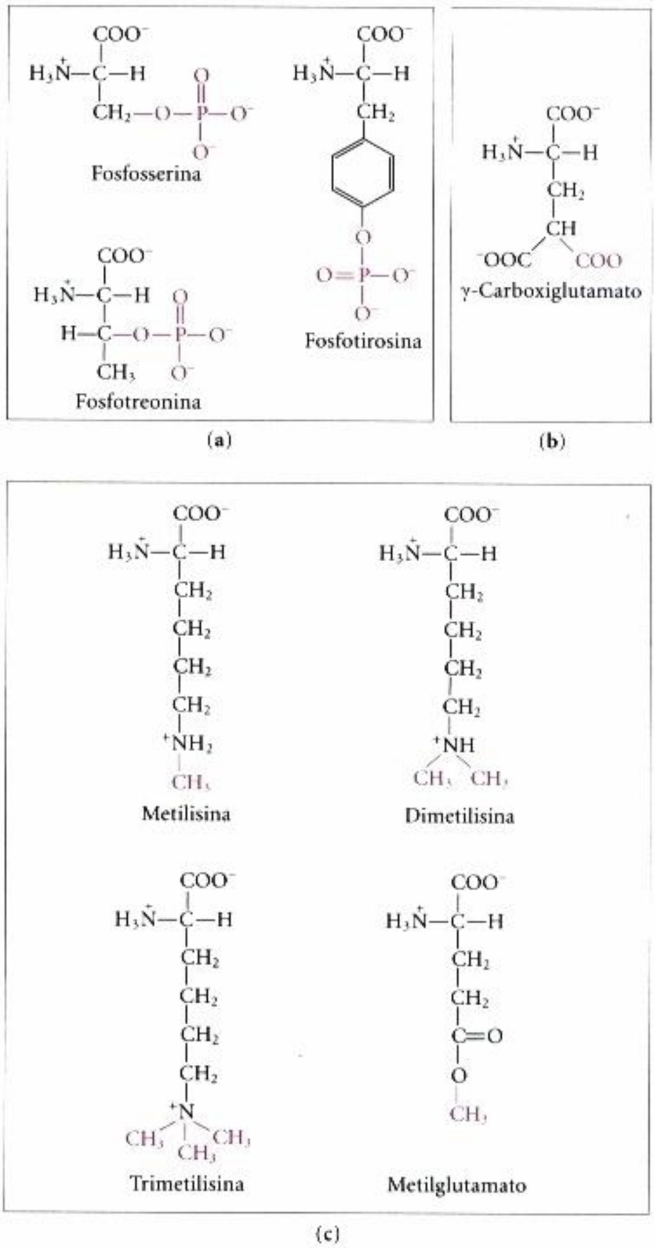


Figura 27-31 – Alguns resíduos de aminoácidos modificados. (**a**) Aminoácidos fosforilados. (**b**) Um aminoácido carboxilado. (**c**) Alguns aminoácidos metilados.

grupo amino do resíduo aminoterminal é *N*-acetilado após a tradução. Resíduos carboxiterminais são, também, algumas vezes modificados.

Perda das seqüências sinalizadoras. Como veremos depois, neste capítulo, os 15 a 30 resíduos na extremidade aminoterminal de algumas proteínas desempenham um papel no direcionamento da proteína à sua destinação final na célula. Tais **seqüências sinalizadoras** são, no final, removidas por peptidases específicas.

Modificações de aminoácidos individuais. Os grupos hidroxila de certos resíduos de Ser, Thr e Tyr de algumas proteínas são enzimaticamente fosforilados pelo ATP (Fig. 27-31a); os grupos fosfato adicionam cargas negativas a esses polipeptídeos. O significado funcional dessa modificação varia de uma proteína para outra. Por exemplo, a caseína, proteína do leite, possui muitos grupos fosfosserina que ligam o Ca^{2+}. Cálcio, fosfato e aminoácidos são todos valiosos para os jovens lactentes, de forma que a caseína fornece, eficientemente, três nutrientes essenciais. Como vimos em numerosos exemplos os ciclos de fosforilação-defosforilação regulam a atividade de muitas enzimas e proteínas regulatórias.

Grupos carboxilas extras podem ser adicionados aos resíduos Glu de algumas proteínas. Por exemplo, a proteína da coagulação do sangue, a protrombina, contém vários resíduos γ-carboxilglutamato (Fig. 27-31b) em sua região aminoterminal, introduzidos por uma enzima que requer a vitamina K. Esses grupos carboxila ligam o Ca^{2+} requerido para iniciar o mecanismo de coagulação.

Resíduos monometil e dimetilisina estão presentes em algumas proteínas musculares e no citocromo *c*. A calmodulina da maioria dos organismos contém um resíduo trimetilisina em uma posição específica. Em outras proteínas, os grupos carboxila de alguns resíduos Glu sofrem metilação (Fig. 27-31c), o que remove sua carga negativa.

Ligação das cadeias laterais de carboidratos. As cadeias laterais de carboidratos das glicoproteínas são covalentemente ligadas, durante ou após a síntese do polipeptídeo. Em algumas glicoproteínas, a cadeia lateral de carboidratos está enzimaticamente ligada a resíduos de Asn (oligossacarídeos *N*-ligados), em outras, a resíduos Ser ou Thr (oligossacarídeos *O*-ligados) (veja Fig. 9-25). Muitas proteínas que funcionam extracelularmente, bem como os proteoglicanos lubrificadores que revestem as membranas mucosas, contêm cadeias laterais de oligossacarídeos (veja Fig. 9-23).

Adição de grupos isoprenil. Várias proteínas eucarióticas são modificadas pela adição de grupos derivados do isopreno (grupos isoprenil). Uma ligação tioéster é formada entre o grupo isoprenil e um resíduo de Cys da proteína (veja Fig. 12-13). Os grupos isoprenil são derivados de intermediários pirofosforilados da via de biossíntese do colesterol (veja Fig. 21-34), como o farnesil pirofosfato (Fig. 27-32). Proteínas modificadas dessa forma incluem as proteínas Ras, produtos do oncogene *ras* e proto-oncogenes, e proteínas G (ambas discutidas no Capítulo 13), e proteínas chamadas de lamininas, encontradas na matriz nuclear. Em alguns casos, o grupo isoprenil ajuda a ancorar a

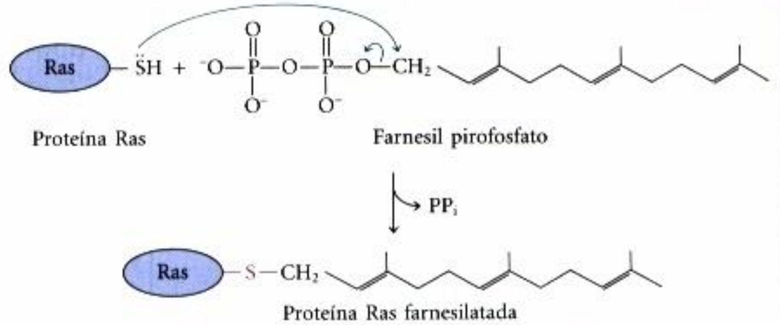


Figura 27-32 – Farnesilação de um resíduo de Cys em uma proteína. A ligação tioéster é mostrada em vermelho. A proteína Ras é o produto do oncogene *ras*.

proteína em uma membrana. A atividade de transformação (carcinogênica) do oncogene *ras* é perdida quando a isoprenilação da proteína Ras é bloqueada, estimulando o interesse na identificação de inibidores dessa via de modificação pós-traducional para uso na quimioterapia do câncer.

Adição de grupos prostéticos. Muitas proteínas procarióticas e eucarióticas requerem, para a sua atividade, grupos prostéticos covalentemente ligados. Dois exemplos são a molécula da biotina da acetil-CoA carboxilase e o grupo heme do citocromo *c*.

Processamento proteolítico. Muitas proteínas são inicialmente sintetizadas como proteínas precursoras maiores inativas, que são proteoliticamente processadas para produzir as suas formas ativas menores. Os exemplos incluem insulina, algumas proteínas virais e proteases, tais como a tripsina e a quimotripsina (veja Fig. 8-31).

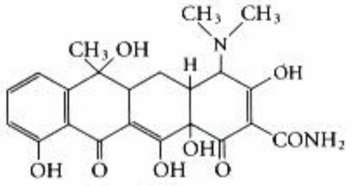
Formação das ligações cruzadas de dissulfeto. Depois de se enrolarem em suas conformações nativas, algumas proteínas formam pontes dissulfeto intra ou intercadeias entre resíduos de Cys. As pontes dissulfeto são comuns em proteínas a serem exportadas de células eucarióticas. As ligações cruzadas, formadas dessa maneira, ajudam a proteger a conformação nativa da molécula da proteína contra a desnaturação, em um ambiente extracelular que pode diferir muito das condições intracelulares e é geralmente oxidante.

A síntese de proteínas é inibida por muitos antibióticos e toxinas

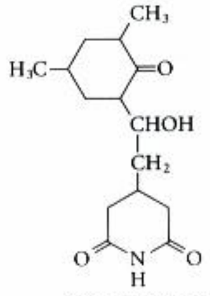
A síntese de proteínas é uma função central da fisiologia celular e o alvo primário de muitos antibióticos e toxinas de ocorrência natural. Exceto onde assinalado, esses antibióticos inibem a síntese de proteínas nas bactérias. As diferenças entre a síntese das proteínas bacterianas e eucarióticas, embora em alguns casos sutis, são suficientes para que a maioria dos compostos discutidos a seguir seja relativamente inócua às células eucarióticas. A seleção natural tem favorecido a evolução de compostos, que exploram aquelas pequenas diferenças a fim de afetar seletivamente os sistemas bacterianos. Essas armas bioquímicas importantes são sintetizadas por alguns microrganismos e são extremamente tóxicas para outros. Pelo fato de que praticamente cada etapa na síntese das proteínas possa ser especificamente inibida por um outro antibiótico, os antibióticos tornaram-se ferramentas valiosas no estudo da síntese de proteínas.

A **puromicina**, sintetizada pelo bolor *Streptomyces alboniger*, é um dos antibióticos inibitórios mais bem conhecidos. Sua estrutura é muito semelhante à extremidade 3' de um aminoacil-tRNA, capacitando-o a se ligar ao sítio A ribossômico e participar da formação da ligação peptídica, produzindo a peptidil-puromicina (Fig. 27-33). Entretanto, pelo fato de a puromicina apenas se assemelhar à extremidade 3' do tRNA, ela não se engaja na translocação e se dissocia do ribossomo logo depois que se liga ao terminal carboxila do peptídeo. Isso termina prematuramente a síntese polipeptídica.

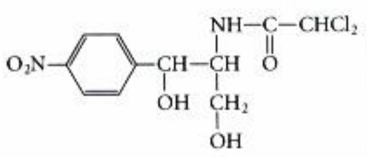
As **tetraciclinas** inibem a síntese de proteínas nas bactérias ao bloquear o sítio A no ribossomo, inibindo a ligação dos aminoacil-tRNAs. O **cloranfenicol** inibe a síntese de proteínas pelos ribossomos bacterianos (também pelos mitocondriais e cloroplastiais) ao bloquear a peptidil transferase; ele não afeta a síntese das proteínas citosólicas nos eucariotos. Contrariamente, a **ciclo-heximida** bloqueia a peptidil transferase dos ribossomos 80S eucarióticos, mas não dos ribossomos 70S bacterianos (e mitocondriais e cloroplastiais). A **estreptomicina**, um trissacarídeo básico, provoca erro de leitura do código genético nas bactérias em concentrações relativamente baixas e inibe a iniciação em concentrações altas.



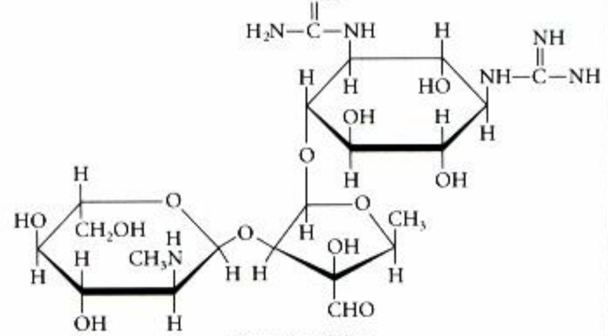
Tetraciclina



Ciclo-heximida



Cloranfenicol



Estreptomicina

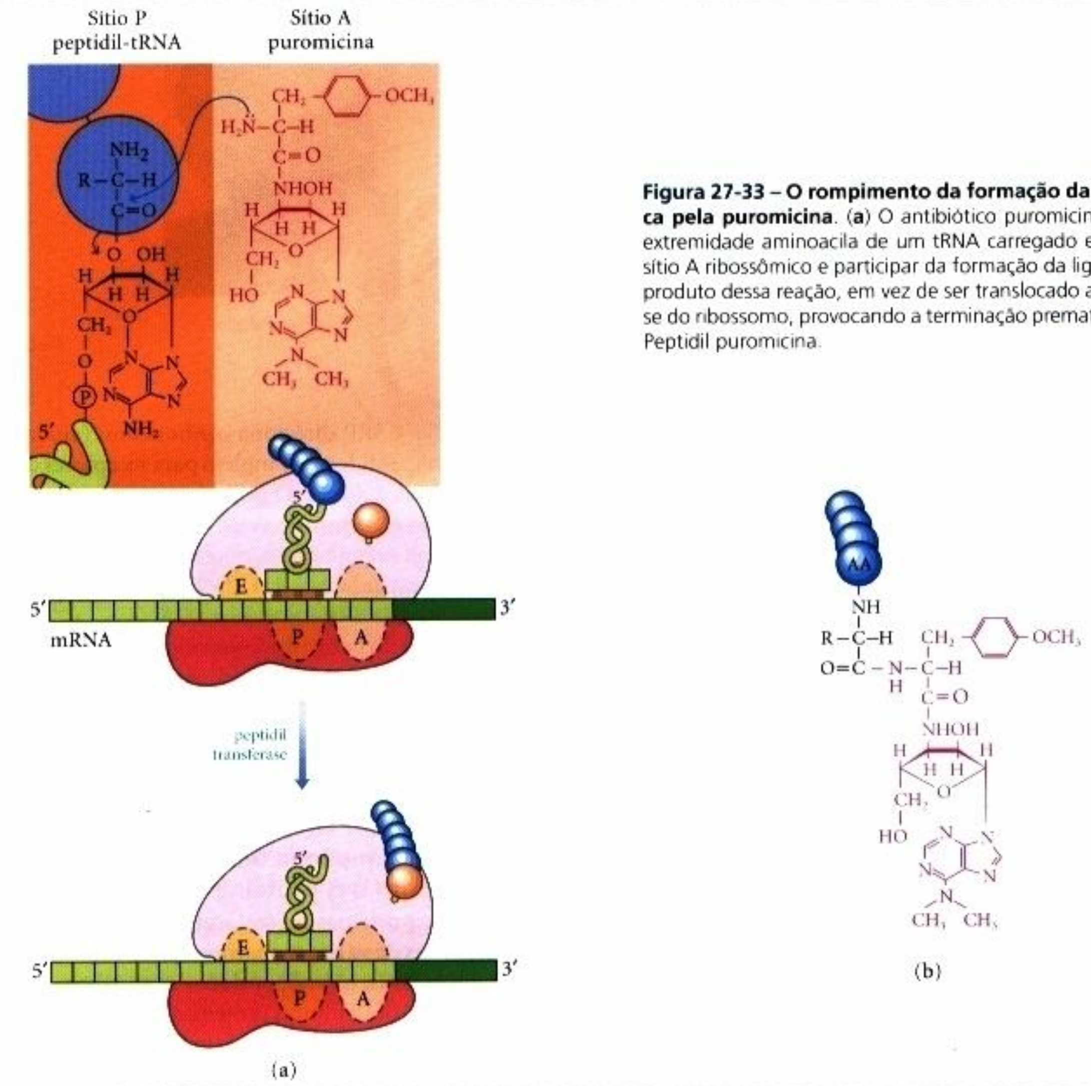


Figura 27-33 – O rompimento da formação da ligação peptídica pela puromicina. (**a**) O antibiótico puromicina assemelha-se à extremidade aminoacila de um tRNA carregado e pode ligar-se ao sítio A ribossômico e participar da formação da ligação peptídica. O produto dessa reação, em vez de ser translocado ao sítio P, dissocia-se do ribossomo, provocando a terminação prematura da cadeia. (**b**) Peptidil puromicina.

Vários outros inibidores da síntese de proteínas são notáveis por causa de sua toxicidade ao homem e a outros mamíferos. A **toxina diftérica** (M_r 65.000) catalisa a ADP-ribosilação de um resíduo da diftamida (uma histidina modificada) do fator de alongamento eEF2 eucariótico, inativando-o. A **ricina**, uma proteína extremamente tóxica da mamona, inativa a subunidade 60S dos ribossomos eucarióticos, pela depurinização de uma adenosina específica no rRNA 23S.

Endereçamento e Degradação das Proteínas

A célula eucariótica é constituída de muitas estruturas, compartimentos e organelas, cada uma com funções específicas, que requerem conjuntos distintos de proteínas e enzimas. A síntese de quase todas essas proteínas é feita nos ribossomos no citosol; então, como elas se direcionam para as suas destinações celulares finais?

Estamos começando a entender esse complexo e fascinante processo. Proteínas destinadas à secreção, integração na membrana plasmática, ou inclusão nos lisossomos, geralmente compartilham algumas etapas iniciais de uma via que começa no retículo endoplasmático (RE). Proteínas destinadas às mitocôndrias, cloroplastos ou núcleo usam três mecanismos separados; proteínas destinadas ao citosol simplesmente permanecem onde foram sintetizadas.

Günter Blobel

O elemento mais importante em muitas dessas vias de endereçamento é uma pequena seqüência de aminoácidos, chamada de **seqüência sinalizadora**, cuja função foi primeiro postulada por David Sabatini e Günter Blobel, em 1970. A seqüência sinalizadora direciona uma proteína para a sua localização apropriada na célula e freqüentemente é removida durante o transporte ou depois que a proteína tiver alcançado o seu destino final. Para proteínas condenadas ao transporte para a mitocôndria, os cloroplastos ou o RE, a seqüência sinalizadora está no aminoterminal de um polipeptídeo recém-sintetizado. Em muitos casos, a capacidade de direcionamento de seqüências sinalizadoras particulares tem sido confirmada pela fusão da seqüência sinalizadora de uma proteína com uma segunda proteína, e mostrando que o sinal direciona a segunda proteína para a localização onde a primeira proteína é normalmente encontrada. A degradação seletiva das proteínas não mais necessárias à célula também repousa amplamente em um conjunto de sinais moleculares, embutidos na estrutura de cada proteína.

Na parte final deste tópico, examinaremos o endereçamento e a degradação de proteínas, com ênfase nos sinais subjacentes e na regulação molecular, tão cruciais para o metabolismo celular. Exceto onde assinalado, o foco está nas células eucarióticas.

A modificação pós-traducional de muitas proteínas eucarióticas começa no retículo endoplasmático

Talvez o sistema de endereçamento mais bem caracterizado comece no RE. A maioria das proteínas lisossômicas, de membrana ou secretadas, possui uma seqüência sinalizadora aminoterminal (Fig. 27-34), que as marca para serem translocadas para dentro da luz do RE; centenas dessas seqüências sinalizadoras foram determinadas. O terminal carboxila da seqüência sinalizadora é definido por um sítio de clivagem, onde a ação proteolítica remove a seqüência sinalizadora, depois que a proteína é importada para dentro do RE. As seqüências variam de 13 a 36 resíduos de aminoácidos de comprimento, mas todas possuem as seguintes características: (1) cerca de 10 a 15 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, (2) um ou mais resíduos de aminoácidos carregados positivamente, usualmente próximo do aminoterminal que precede a seqüência hidrofóbica, e (3) uma seqüência curta no carboxiterminal (próxima ao sítio de clivagem), que é relativamente polar, tipicamente possuindo resíduos de aminoácidos com cadeias laterais curtas (especialmente Ala), nas posições mais próximas do sítio de clivagem.

Como originalmente demonstrado por George Palade, as proteínas com essas seqüências sinalizadoras são sintetizadas nos ribossomos ligados ao RE. A própria seqüência sinalizadora ajuda a direcionar o ribossomo para o RE (Fig. 27-35). A via de endereçamento começa com a iniciação da síntese de proteínas nos ribossomos livres. A seqüência sinalizadora aparece no começo do processo sintetizante, porque ela está no aminoterminal, que é sintetizado primeiro. À medida que ela emerge do ribossomo, essa seqüência e o próprio ribossomo são rapidamente ligados pela grande **partícula de reconhecimento da sinalização** (SRP — "*s*ignal *r*ecognition *p*article"). A SRP, então, liga-se ao GTP e pára o alongamento do polipeptídeo quando ele estiver com cerca de 70 aminoácidos de comprimento e a seqüência sinalizadora tiver emergido completamente do ribossomo.

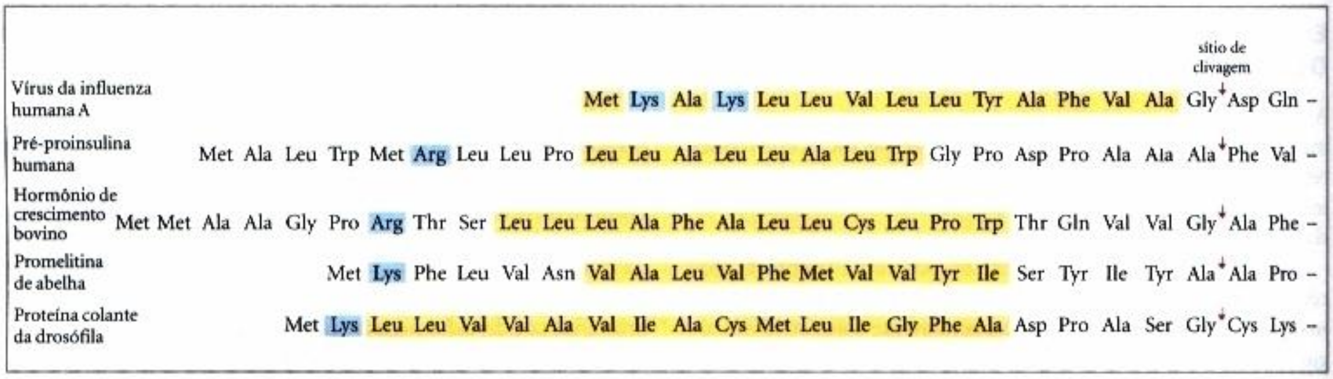
George Palade

O GTP ligado à SRP direciona o ribossomo (ainda ligado ao mRNA) e o polipeptídeo incompleto para receptores do GTP-SRP na face citosólica do RE. O polipeptídeo nascente é entregue a um **complexo de translocação do peptídeo** no RE, que pode interagir diretamente com o ribossomo. A SRP dissocia-se do ribossomo, acompanhada pela hidrólise do GTP tanto na SRP quanto no receptor da SRP.

O alongamento do polipeptídeo recomeça, com o complexo de translocação direcionado pelo ATP abastecendo com o polipeptídeo crescente dentro do lúmen do RE, até que a proteína completa tenha sido sintetizada. A seqüência sinalizadora é, então, removida por uma peptidase sinal dentro da luz do RE. O ribossomo dissocia-se e é reciclado.

A glicosilação desempenha um papel-chave no endereçamento das proteínas

Na luz do RE, as proteínas recém-sintetizadas são posteriormente modificadas de várias maneiras. Após a remoção das seqüências sinalizadoras, os polipeptídeos se enrolam, as pontes dissulfeto são formadas e muitas proteínas são glicosiladas. Proteínas glicosiladas, ou glicoproteínas, freqüentemente são ligadas a seus oligossacarídeos por meio de resíduos de Asn. Esses oligossacarídeos *N*-ligados são muito diversos (Capítulo 9), mas as vias pelas quais se formam possuem uma primeira etapa comum. Um núcleo de 14 resíduos de oligossacarídeos é construído passo a passo, depois transferido de uma molécula doadora de dolicol fosfato para certos resíduos de Asn nas proteínas (Fig. 27-36). A transferase está na face luminal do RE e, portanto, não consegue catalisar a glicosilação das proteínas citosólicas. Depois da transferência, o núcleo oligossacarídeo é cortado e elaborado de maneiras diferentes nas diferentes proteínas; entretanto, todos os oligossacarídeos *N*-ligados retêm um



	sítio de clivagem
Vírus da influenza humana A	Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Tyr Ala Phe Val Ala Gly↓Asp Gln –
Pré-proinsulina humana	Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala↓Phe Val –
Hormônio de crescimento bovino	Met Met Ala Ala Gly Pro Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Ala Leu Leu Cys Leu Pro Trp Thr Gln Val Val Gly↓Ala Phe –
Promelitina de abelha	Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile Ser Tyr Ile Tyr Ala↓Ala Pro –
Proteína colante da drosófila	Met Lys Leu Leu Val Val Ala Val Ile Ala Cys Met Leu Ile Gly Phe Ala Asp Pro Ala Ser Gly↓Cys Lys –

Figura 27-34 – Translocação para dentro do RE, direcionada pela seqüência sinalizadora aminoterminal de algumas proteínas eucarióticas. O núcleo hidrofóbico (amarelo) é precedido por um ou mais resíduos básicos (azul). Observe os resíduos polares e de cadeia lateral curta, imediatamente precedendo os sítios de clivagem (indicados por setas vermelhas).

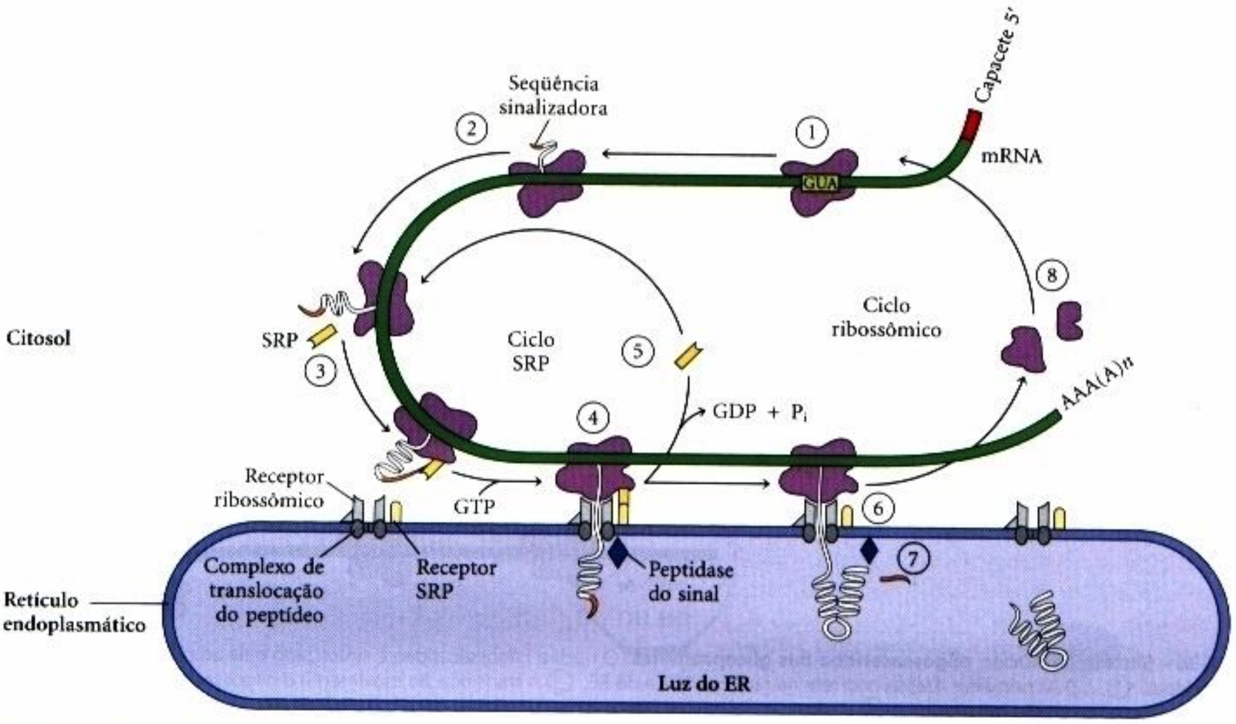
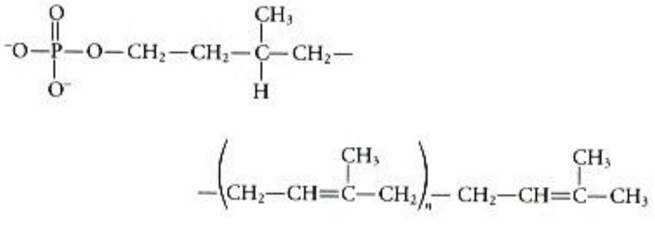

Capacete 5'
Seqüência sinalizadora
②
①
GUA
mRNA
⑧
Citosol
SRP
③
Ciclo SRP
⑤
Ciclo ribossômico
AAA(A)n
④
GDP + Pi
Receptor ribossômico
GTP
⑥
⑦
Complexo de translocação do peptídeo
Receptor SRP
Peptidase do sinal
Retículo endoplasmático
Luz do ER

Figura 27-35 – Direcionando proteínas eucarióticas com os sinais apropriados para o retículo endoplasmático. Esse processo envolve o ciclo da SRP e a translocação e clivagem do polipeptídeo nascente. ① As subunidades ribossômicas montam-se em um complexo de iniciação no códon de iniciação e iniciam a síntese de proteínas. ② Se uma seqüência sinalizadora apropriada aparecer no aminoterminal do polipeptídeo nascente, ③ a SRP liga-se ao ribossomo e ao GTP e pára o alongamento. ④ O complexo ribossomo-SRP é ligado por receptores no RE, que também ligam o GTP. ⑤ A SRP dissocia-se e é reciclada, acompanhada pela hidrólise do GTP tanto na SRP quanto no receptor. ⑥ A síntese de proteínas recomeça, acoplada à translocação da cadeia polipeptídica para dentro da luz do RE, por meio do complexo de translocação do peptídeo. ⑦ A seqüência sinalizadora é clivada, do polipeptídeo nascente, por uma peptidase sinal dentro da luz do RE. ⑧ As subunidades ribossômicas dissociam-se do mRNA e são recicladas.

A SRP é um complexo em forma de bastão, que contém um RNA de 300 nucleotídeos (7SL-RNA) e seis proteínas diferentes, com um peso molecular combinado de 325.000. Uma subunidade protéica da SRP liga-se diretamente à seqüência sinalizadora, inibindo o alongamento ao bloquear estericamente a entrada dos aminoacil-tRNAs, inibindo a peptidil transferase. Uma outra subunidade protéica liga-se e hidrolisa o GTP. O receptor da SRP é um heterodímero das subunidades a (M_r 69.000) e b (M_r 30.000), as quais ligam e hidrolisam GTP nessa via de endereçamento.

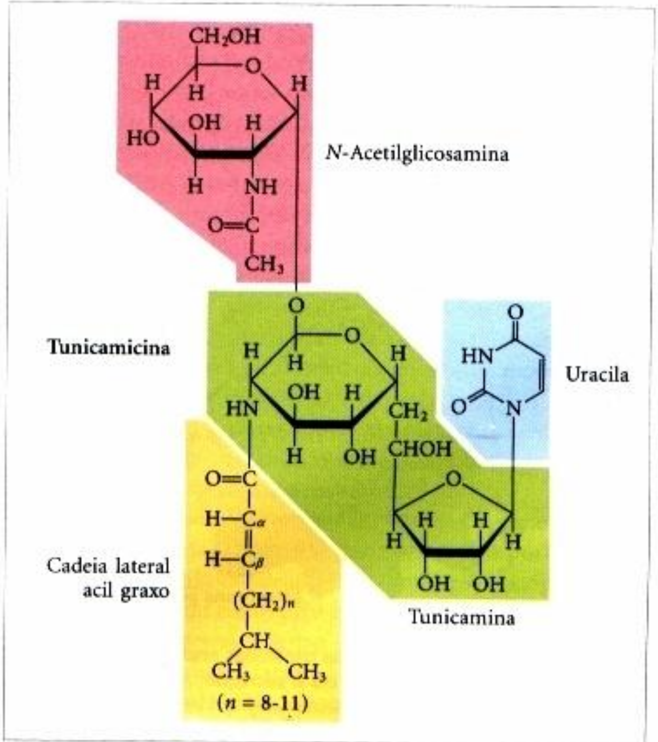
núcleo pentassacarídeo, derivado dos 14 resíduos do oligossacarídeo original. Vários antibióticos agem interferindo em uma ou mais etapas desse processo e têm ajudado a elucidar as etapas da glicosilação de proteínas. O mais bem caracterizado é a **tunicamicina**, que mimetiza a estrutura da UDP–*N*-acetilglicosamina e bloqueia a primeira etapa do processo.



$$^{-}O-\overset{O}{\overset{\|}{P}}(-O^{-})-O-CH_2-CH_2-\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}H-CH_2-\left(CH_2-CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}-CH_2\right)_n-CH_2-CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}-CH_3$$

Dolicol fosfato
(n = 9-22)

Em seguida, proteínas modificadas adequadamente podem ser movidas para uma variedade de distinos intracelulares. As proteínas movem-se do RE para o complexo de Golgi em vesículas transportadoras (Fig. 27-37). No complexo de Golgi, oligossacarídeos *O*-ligados são adicionados e os oligossacarídeos *N*-ligados são ainda mais modificados. Por mecanismos ainda


N-Acetilglicosamina
Tunicamicina
Uracila
Cadeia lateral acil graxo
Tunicamina
(n = 8-11)

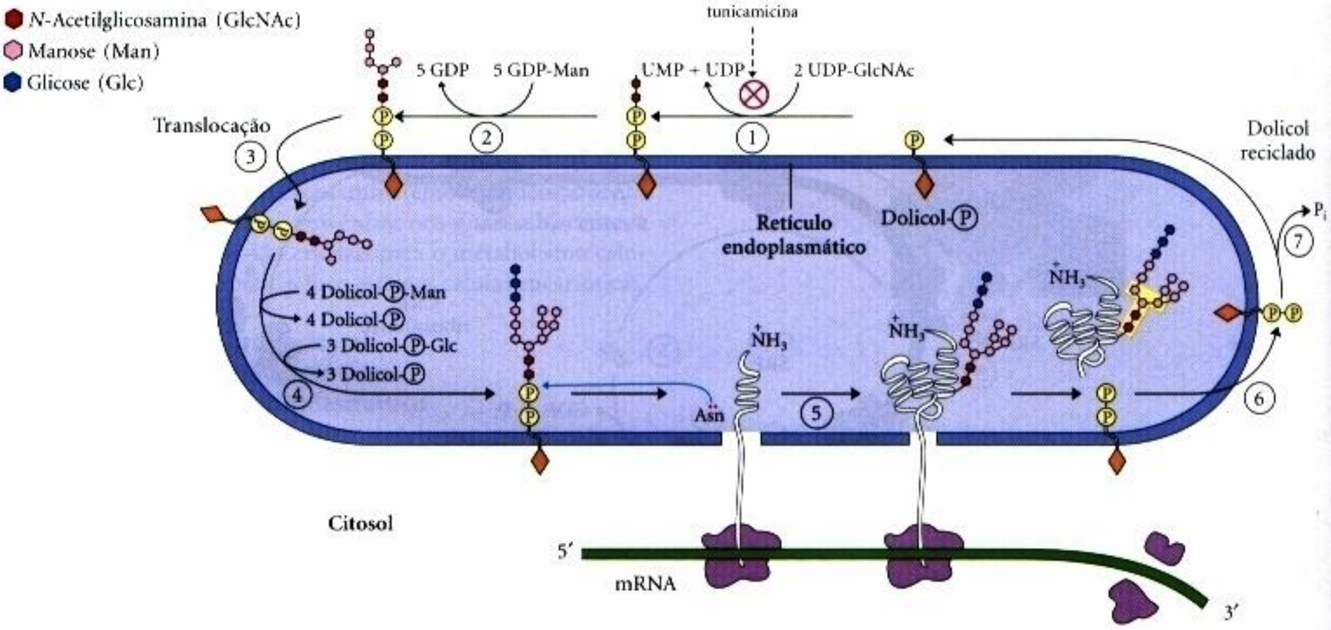

⬢ N-Acetilglicosamina (GlcNAc)
⬢ Manose (Man)
⬢ Glicose (Glc)
tunicamicina
5 GDP
5 GDP-Man
UMP + UDP
2 UDP-GlcNAc
Translocação
③
②
①
Dolicol reciclado
Retículo endoplasmático
Dolicol-Ⓟ
Pi
⑦
4 Dolicol-Ⓟ-Man
4 Dolicol-Ⓟ
3 Dolicol-Ⓟ-Glc
3 Dolicol-Ⓟ
④
NH3
Asn
⑤
⑥
Citosol
5′
mRNA
3′

Figura 27-36 – Síntese do núcleo oligossacarídeo das glicoproteínas. O núcleo oligossacarídeo é sintetizado pela adição sucessiva de unidades monossacarídeas. ①, ② As primeiras etapas ocorrem na face cisotólica do RE. ③ A translocação movimenta o oligossacarídeo incompleto através da membrana (mecanismo não mostrado), e ④ o término do núcleo oligossacarídeo ocorre dentro da luz do RE. Os precursores sintetizados que levam resíduos adicionais de glicose e manose ao oligossacarídeo crescente na luz são derivados do dolicol fosfato. ⑤ Na primeira etapa da construção da porção oligossacarídea *N*-ligada a uma glicoproteína, o núcleo oligossacarídeo é transferido do dolicol fosfato a um resíduo Asn da proteína dentro da luz do RE. O núcleo oligossacarídeo é então modificado no RE e no complexo de Golgi em vias que diferem para distintas proteínas. Os cinco resíduos de açúcar envoltos pela cor bege (canto inferior direito) são mantidos na estrutura final do oligossacarídeo *N*-ligado. ⑥ O dolicol pirofosfato liberado é novamente translocado de forma que o pirofosfato esteja na face citosólica do RE, então ⑦ um fosfato é removido por hidrólise para regenerar o dolicol fosfato.

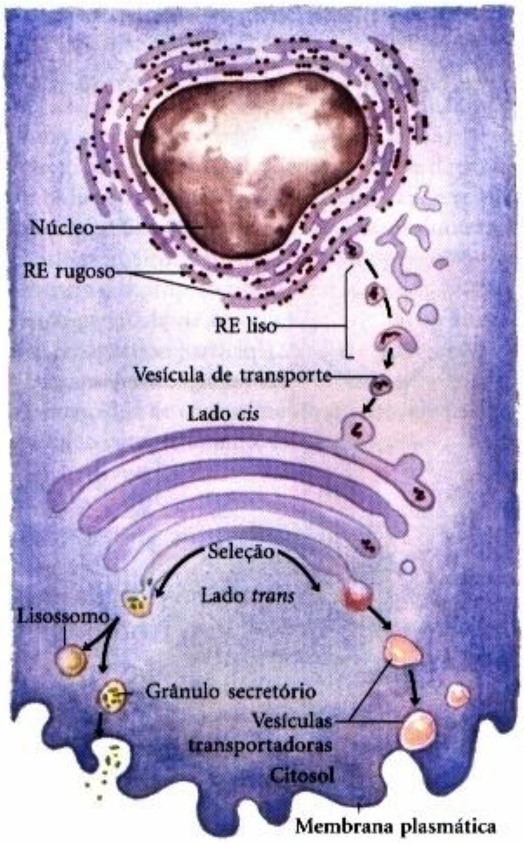

Núcleo
RE rugoso
RE liso
Vesícula de transporte
Lado *cis*
Seleção
Lado *trans*
Lisossomo
Grânulo secretório
Vesículas transportadoras
Citosol
Membrana plasmática

Figura 27-37 – Vias tomadas pelas proteínas endereçadas aos lisossomos, à membrana plasmática ou à secreção. As proteínas movem-se do RE para o lado *cis* do complexo de Golgi em vesículas transportadoras. A seleção ocorre, primeiramente, no lado *trans* do complexo de Golgi.

não entendidos completamente, as proteínas são também selecionadas aqui e enviadas a seu destino final. Dentro do complexo de Golgi, os processos que selecionam as proteínas endereçadas para a secreção daquelas endereçadas à membrana plasmática ou aos lisossomos devem distinguir entre essas proteínas na base de características estruturais outras que a seqüência sinalizadora, que foi removida na luz do RE.

Esse processo de seleção é mais bem entendido no caso das hidrolases, destinadas para o transporte aos lisossomos. Ao chegar ao complexo de Golgi, vindas do RE, alguma característica ainda não identificada da estrutura tridimensional dessas hidrolases (algumas vezes chamada de um "sinal embutido") é reconhecida por uma fosfotransferase que fosforila certos resíduos de manose nos oligossacarídeos (Fig. 27-38). A presença de um ou mais resíduos de manose-6-fosfato em seus oligossacarídeos *N*-ligados é o sinal estrutural que direciona a proteína aos lisossomos. Uma proteína receptora na membrana do complexo de Golgi reconhece esse sinal da manose-6-fosfato e liga-se à hidrolase marcada dessa forma. Vesículas contendo esses complexos receptor-hidrolase brotam do lado *trans* do complexo de Golgi e seguem seu caminho para as vesículas de seleção. Aqui, o complexo receptor-hidrolase dissocia-se em um processo facilitado pelo pH mais baixo dentro das vesículas de seleção e pela remoção dos grupos fosfato dos resíduos da manose-6-fosfato, catalisada por uma fosfatase. O receptor é, então, reciclado ao complexo de Golgi e as vesículas que contêm as hidrolases brotam das vesículas de seleção e movem-se para os lisossomos. Nas células tratadas com tunicamicina, as hidrolases, que deveriam ser normalmente endereçadas aos lisossomos, são, em vez disso, secretadas, confirmando que o oligossacarídeo *N*-ligado desempenha um papel-chave no endereçamento dessas enzimas aos lisossomos.

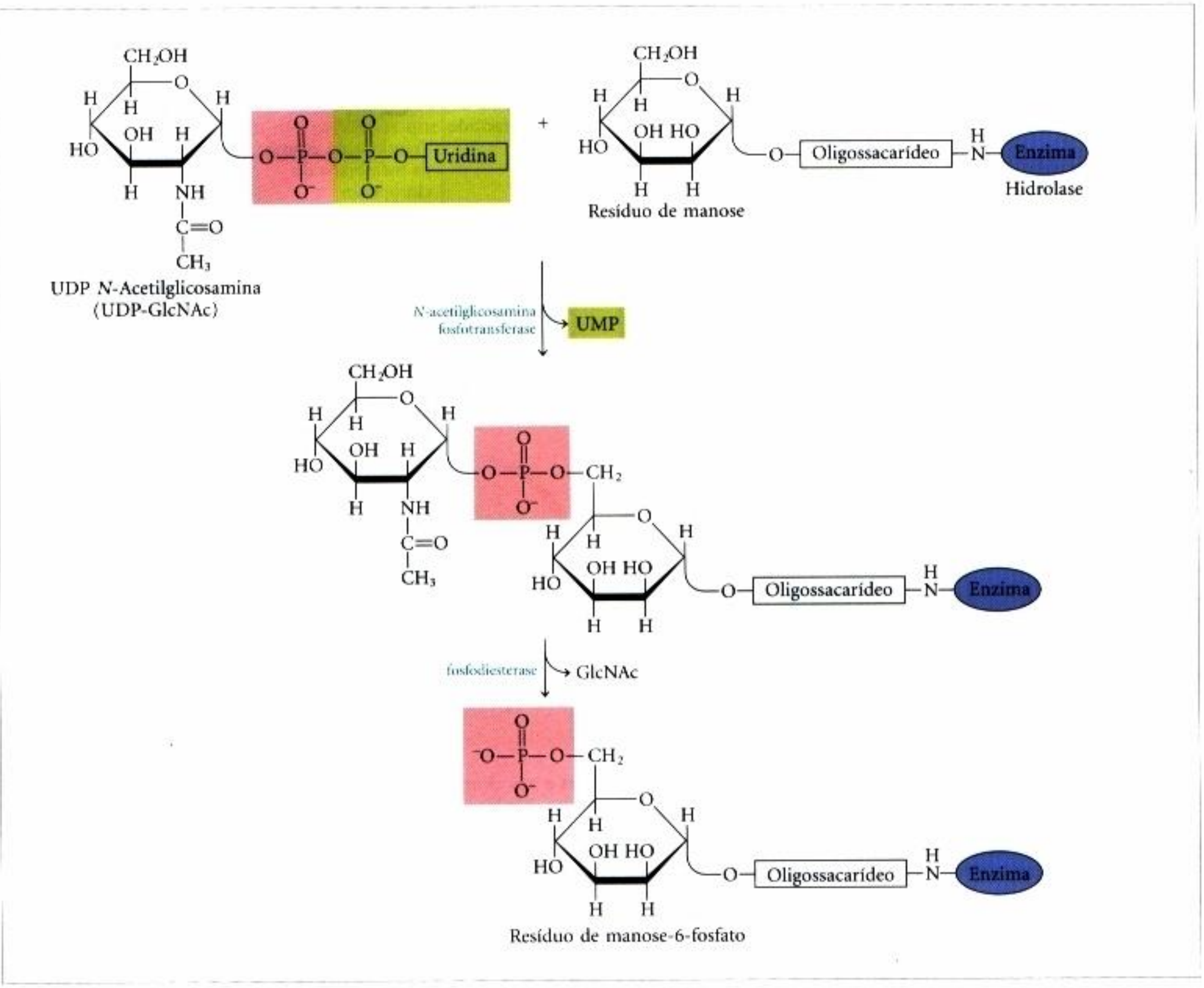


Figura 27-38 – Fosforilação de resíduos de manose nas enzimas endereçadas aos lisossomos. A *N*-acetilglicosamina fosfotransferase reconhece alguma característica estrutural ainda não identificada das hidrolases endereçadas aos lisossomos.

As proteínas são endereçadas às mitocôndrias e aos cloroplastos por vias semelhantes

Embora as mitocôndrias e os cloroplastos contenham DNA, a maioria de suas proteínas são codificadas pelo DNA nuclear e devem ser endereçadas à organela apropriada. Ao contrário das proteínas endereçadas ao RE, as vias de endereçamento à mitocôndria e ao cloroplasto podem começar *depois* que uma proteína precursora tiver sido completamente sintetizada e liberada do ribossomo. No entanto, há semelhanças entre as três vias de endereçamento.

Proteínas precursoras, destinadas às mitocôndrias ou aos cloroplastos, possuem seqüências sinalizadoras aminoterminal, que são ligadas por proteínas chaperonas citosólicas (pág. 153). Os precursores são entregues aos receptores na superfície externa da organela-alvo e depois a um canal protéico, que usualmente atravessa as membranas interna e externa da organela. A translocação através do canal é facilitada pela hidrólise do ATP ou GTP e, em alguns casos, por um potencial eletroquímico transmembrana. Dentro da organela, a seqüência sinalizadora do precursor é removida, e a proteína madura é reenrolada (Fig. 27-39).

As seqüências sinalizadoras mitocondriais têm, geralmente, de 20 a 35 resíduos de aminoácidos de comprimento e são ricas em Ser, Thr e resíduos básicos. As proteínas precursoras mitocondriais tornam-se ligadas ou pela Hsp70 ("*h*eat *s*hock *p*rotein 70", ou proteína de choque térmico 70) ou MSF ("*m*itochondrial import *s*timulation *f*actor", ou fator de estimulação de importação mitocondrial). Essas chaperonas moleculares estabilizam as conformações desenroladas das proteínas precursoras. O MSF é específico da mitocôndria; a Hsp70 pertence a uma classe comum de proteínas chaperonas, encontradas nas células bacterianas e eucarióticas (veja Fig. 6-30).

O precursor da proteína mitocondrial ligada é entregue a uma proteína do complexo chamado de Tom ("*t*ransport across the *o*uter *m*embrane", ou transporte através da membrana externa), o receptor mitocondrial, e depois a um outro complexo Tom, que forma um canal através da membrana externa (Fig. 27-39a). Uma outra proteína do complexo, conhecida como Tim ("*t*ransport across the *i*nner *m*embrane", ou transporte através da membrana interna), transloca o precursor para dentro da matriz mitocondrial. A translocação é abastecida por interações com a proteína mitocondrial Hsp70 (mHsp70) acoplada à hidrólise do ATP, bem como pelo gradiente eletroquímico através da membrana interna. Dentro da matriz, o enovelamento da proteína mitocondrial é facilitado por várias proteínas chaperonas (incluindo a mHsp70), e a seqüência sinalizadora é removida na matriz por uma protease processadora.

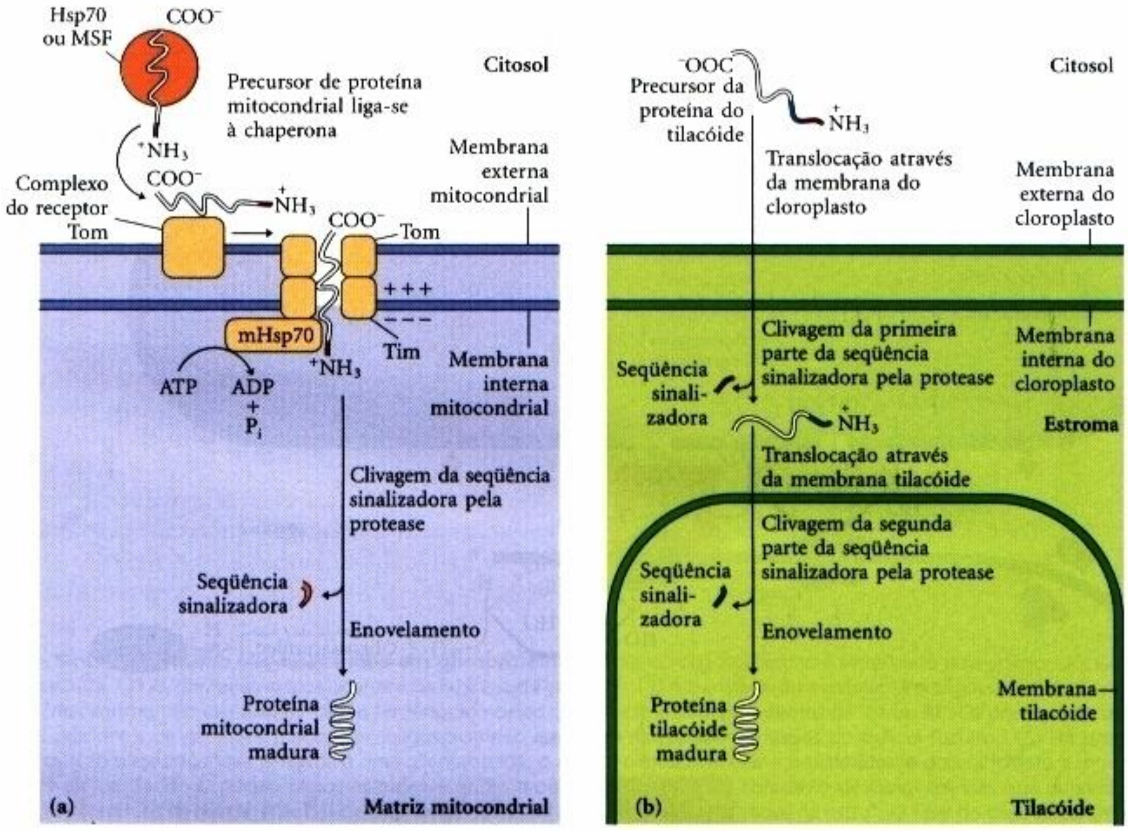

Hsp70
ou MSF
COO^-
Precursor de proteína
mitocondrial liga-se
à chaperona
Citosol
$^+NH_3$
COO^-
Complexo
do receptor
Tom
$\overset{+}{N}H_3$
COO^-
Tom
Membrana
externa
mitocondrial
+++
---
mHsp70
Tim
$^+NH_3$
ATP
ADP
+
P_i
Membrana
interna
mitocondrial
Clivagem da seqüência
sinalizadora pela
protease
Seqüência
sinalizadora
Envelamento
Proteína
mitocondrial
madura
(a)
Matriz mitocondrial
^-OOC
Precursor da
proteína do
tilacóide
$\overset{+}{N}H_3$
Citosol
Translocação através
da membrana do
cloroplasto
Membrana
externa do
cloroplasto
Clivagem da primeira
parte da seqüência
sinalizadora pela protease
Membrana
interna do
cloroplasto
Seqüência
sinali-
zadora
$\overset{+}{N}H_3$
Estroma
Translocação através
da membrana tilacóide
Clivagem da segunda
parte da seqüência
sinalizadora pela protease
Seqüência
sinali-
zadora
Envelamento
Membrana
tilacóide
Proteína
tilacóide
madura
(b)
Tilacóide

Figura 27-39 – Endereçamento de proteínas às mitocôndrias e aos cloroplastos. (**a**) Endereçamento à matriz mitocondrial. Um precursor de uma proteína mitocondrial é ligado a uma chaperona citosólica (Hsp70 ou MSF) e entregue a um complexo receptor Tom, depois a um canal da membrana constituído de canais complexos Tom e Tim. A translocação da proteína precursora é direcionada pela ATPase da proteína Hsp70 mitocondrial (mHsp70) do lado da matriz da membrana mitocondrial interna e pelo potencial eletroquímico através da membrana interna. A seqüência sinalizadora é clivada na matriz mitocondrial, e a proteína se enrola na sua conformação funcional. (**b**) Proteínas endereçadas aos tilacóides dos cloroplastos possuem seqüências sinalizadoras bipartidas. A primeira etapa da seqüência (em vermelho) medeia o endereçamento ao estroma do cloroplasto, onde ela é removida; a segunda parte (em azul) medeia a translocação para dentro da luz do tilacóide, onde ela é, por sua vez, removida.

Algumas seqüências sinalizadoras mitocondriais complexas incluem sinais de "transferência interrompida". Quando esse sinal é reconhecido durante o transporte da proteína precursora mitocondrial através do canal da membrana, a translocação é interrompida no ponto em que um trecho de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos no precursor atravessa ou a membrana mitocondrial interna ou a externa. A proteína é, então, liberada para gerar uma proteína de membrana integral. Em alguns casos, uma seqüência, que se espalha pela membrana interna, é clivada para criar uma proteína solúvel do espaço intermembranoso.

O endereçamento de proteínas precursoras aos cloroplastos segue um padrão semelhante. Uma variação interessante ocorre nas proteínas endereçadas aos tilacóides (Fig. 27-39b). Essas proteínas possuem uma seqüência sinalizadora bipartida. A porção aminoterminal da seqüência sinalizadora endereça a proteína ao estroma, antes de ser clivada; o restante da seqüência endereça, então, a proteína aos tilacóides.

As seqüências sinalizadoras para o transporte nuclear não são clivadas

A comunicação molecular entre o núcleo e o citosol requer a movimentação de macromoléculas através de poros nucleares (veja Fig. 2-11). As moléculas de RNA, sintetizadas no núcleo, são exportadas para o citoplasma. As proteínas ribossomais, sintetizadas nos ribossomos citosólicos, são importadas para dentro do núcleo e montadas nas subunidades ribossômicas 60S e 40S no nucléolo; subunidades completas são, então, exportadas de volta ao citosol. Uma variedade de proteínas nucleares (RNA e DNA polimerases, histonas, topoisomerases, proteínas que regulam a expressão gênica, e assim por diante) são sintetizadas no citosol e importadas para dentro do núcleo. Esse tráfego é modulado por um complexo sistema de sinais moleculares e proteínas transportadoras que está sendo gradualmente elucidado.

Na maioria dos eucariotos multicelulares, o envelope nuclear se quebra a cada divisão celular. Uma vez que a divisão celular é completada e o envelope nuclear é reestabelecido, as proteínas nucleares dispersadas devem ser reimportadas. Para permitir repetidas importações nucleares, a seqüência sinalizadora que endereça uma proteína ao núcleo (a seqüência de localização nuclear, NLS — "*n*uclear *l*ocalization *s*equence") não é removida. Em vez de ocorrer no aminoterminal, uma NLS pode estar localizada em qualquer outro lugar ao longo da seqüência primária de uma proteína nuclear.

A importação nuclear é mediada por várias proteínas que circulam entre o citosol e o núcleo (Fig. 27-40), incluindo a importina α e β e uma GTPase pequena, chamada de Ran. Um heterodímero da importina α e β funciona como um receptor solúvel para as proteínas endereçadas ao núcleo, com a subunidade α ligando-se a proteínas que contêm NLS no citosol. O complexo da proteína que contém a NLS e a importina aporta em um poro nuclear e é translocado através do poro, por um mecanismo dependente de energia que requer a GTPase Ran. As duas subunidades da importina se separam durante a translocação, e a proteína que contém a NLS se dissocia da importina α, dentro do núcleo. As importinas α e β são, então, exportadas do núcleo para repetir o processo. A forma como a importina α permanece dissociada de muitas proteínas que contêm a NLS dentro do núcleo ainda não é conhecida.

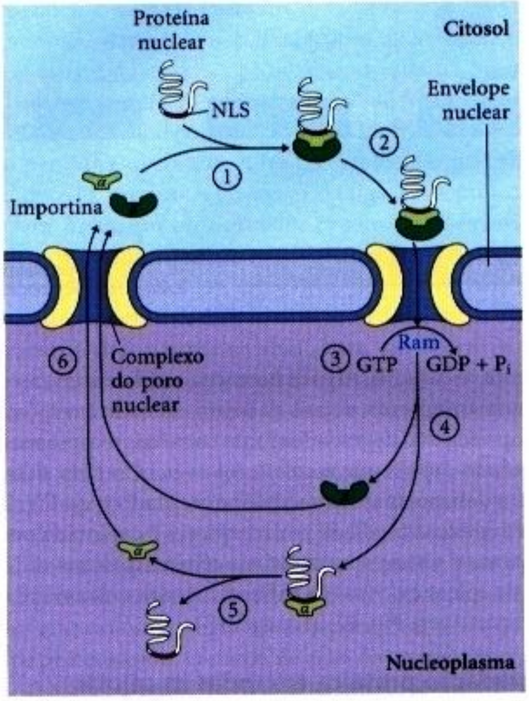


Figura 27-40 – Endereçamento de proteínas nucleares. ① Uma proteína com uma sinalização de localização nuclear (NLS) apropriada é ligada a um complexo de importinas α e β. ② O complexo resultante se liga a um poro nuclear e ③ a translocação é mediada pela GTPase Ran. ④ Dentro do núcleo, a importina β se dissocia da importina α e ⑤ a importina α, então, dissocia-se da proteína nuclear. ⑥ As importinas α e β são transportadas para fora do núcleo e recicladas.

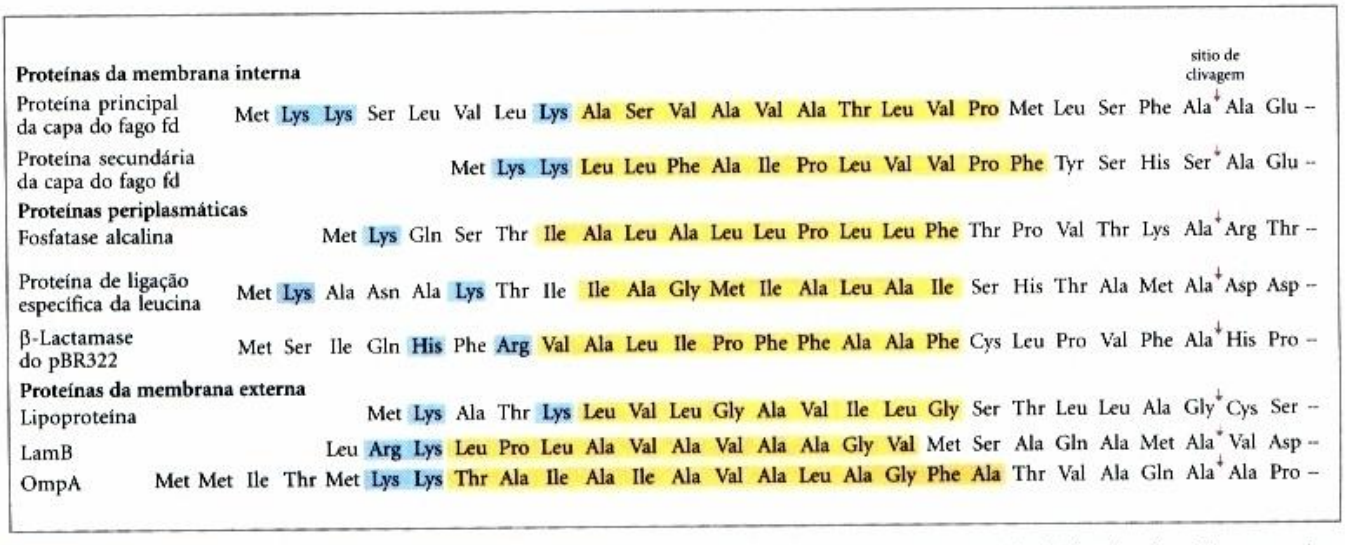
As bactérias também usam seqüências sinalizadoras para o endereçamento das proteínas

As bactérias podem também endereçar algumas proteínas para as suas membranas interna ou externa, para o espaço periplasmático entre essas membranas ou para o meio extracelular. Elas usam seqüências sinalizadoras no aminoterminal das proteínas (Fig. 27-41), muito parecidas àquelas encontradas nas proteínas eucarióticas endereçadas ao RE, às mitocôndrias e aos cloroplastos.

A maioria das proteínas que são exportadas da *E. coli* faz uso da via mostrada na Figura 27-42. Depois da tradução, uma proteína a ser exportada pode enrolar-se apenas lentamente, a seqüência sinalizadora aminoterminal impedindo o enovelamento. A proteína chaperona solúvel SecB se liga à seqüência sinalizadora da proteína ou a outras características da sua estrutura incompletamente enrolada. A proteína ligada é, então, entregue à SecA, uma proteína associada à superfície interna da membrana citoplasmática. SecA age tanto como um receptor como uma ATPase translocadora. Liberada de SecB e ligada a SecA, a proteína é entregue a um complexo de translocação na membrana, constituído de SecY, E e G, e é translocada passo a passo através da membrana no complexo SecYEG, em pedaços de cerca de 20 resíduos de aminoácidos. Cada etapa é facilitada pela hidrólise do ATP, catalisada pela SecA.

Uma proteína exportada é, dessa forma, empurrada através da membrana por uma proteína SecA, localizada na superfície citoplasmática, em vez de ser puxada através da membrana por uma proteína (à semelhança da Hsp70 mitocondrial) localizada na superfície perisplasmática. Essa diferença pode, simplesmente, refletir a necessidade de a ATPase translocadora estar onde o ATP estiver. O potencial eletroquímico transmembrana pode também fornecer energia para a translocação de uma proteína que está sendo transportada, por um mecanismo ainda não entendido.

Embora a maioria das proteínas bacterianas exportadas use essa via, algumas seguem uma via alternativa, que usa um sinal de reconhecimento e proteínas receptoras homólogas aos componentes da SRP eucariótica e do receptor da SRP (Fig. 27-35).



	sítio de clivagem
Proteínas da membrana interna	
Proteína principal da capa do fago fd	Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala↓Ala Glu –
Proteína secundária da capa do fago fd	Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser↓Ala Glu –
Proteínas periplasmáticas	
Fosfatase alcalina	Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala↓Arg Thr –
Proteína de ligação específica da leucina	Met Lys Ala Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala Ile Ser His Thr Ala Met Ala↓Asp Asp –
β-Lactamase do pBR322	Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe Ala↓His Pro –
Proteínas da membrana externa	
Lipoproteína	Met Lys Ala Thr Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ala Gly↓Cys Ser –
LamB	Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala↓Val Asp –
OmpA	Met Met Ile Thr Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala↓Ala Pro –

Figura 27-41 – Seqüências sinalizadoras endereçam a diferentes localizações nas bactérias. Os aminoácidos básicos (azul) próximos ao aminoterminal e ao núcleo de aminoácidos hidrofóbicos (amarelo) são destacados. Os sítios de clivagem que marcam as extremidades das seqüências sinalizadoras estão indicados por setas vermelhas. Observe que a membrana celular bacteriana interna (veja Fig. 2-5) está onde as proteínas da capa do fago fd e o DNA são montados em partículas do fago. OmpA é a proteína A da membrana externa ("*outer membrane protein A*"); LamB é uma proteína receptora da superfície celular para o bacteriófago lambda.

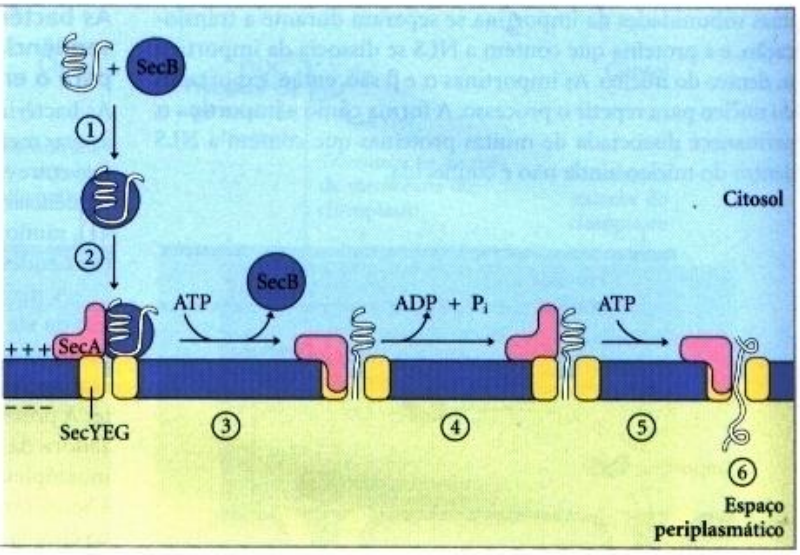


Figura 27-42 – Modelo para a exportação de proteínas nas bactérias. ① Um polipeptídeo recém-traduzido se liga à proteína chaperona citosólica SecB, que ② entrega-a à SecA, uma proteína associada ao complexo de translocação (SecYEG), na membrana citoplasmática bacteriana. ③ SecB é liberada e SecA insere-se na membrana, forçando cerca de 20 resíduos de aminoácidos da proteína a ser exportada dentro do complexo de translocação. ④ A hidrólise de um ATP pela SecA fornece a energia para uma mudança conformacional, que induz SecA a se retirar da membrana, liberando o polipeptídeo. ⑤ SecA liga-se a outro ATP, e o próximo trecho de 20 resíduos de aminoácidos é empurrado através da membrana através do complexo de translocação. As etapas ④ e ⑤ são repetidas até que ⑥ a proteína inteira tenha passado e seja liberada ao periplasma. O potencial eletroquímico através da membrana também fornece um pouco da força propulsora requerida para a translocação da proteína.

As células importam proteínas pela endocitose mediada por receptores

Algumas proteínas são importadas do meio circundante para dentro das células; os exemplos incluem a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a proteína transferrina, transportadora de ferro, os hormônios peptídeos e as proteínas circulantes, destinadas à degradação. Essas proteínas se ligam a receptores nas invaginações da membrana, chamadas de **depressões revestidas** ("coated pits"), que concentram os receptores destinados à endocitose, em preferência a outras proteínas da superfície celular. As depressões são revestidas em seu lado citosólico com uma treliça da proteína **clatrina**, que forma estruturas poliédricas fechadas (Fig. 27-43). À medida que mais receptores se tornam ocupados com as proteínas-alvo, a treliça da clatrina cresce, até que uma vesícula endocítica completa, envolta por membrana, brota da membrana plasmática e se move para dentro do citoplasma. A clatrina é rapidamente removida por enzimas de desrevestimento e as vesículas fundem-se com um endossomo. A atividade das ATPases nas membranas endossomais reduz o pH, facilitando a dissociação dos receptores de suas proteínas-alvo.

As proteínas importadas e os receptores, então, seguem seus caminhos separados e seus destinos variam de acordo com a célula e o tipo de proteína. A transferrina e seu receptor são, eventualmente, reciclados. Alguns hormônios, fatores de crescimento e imunocomplexos, depois de terem elicitado a resposta celular apropriada, são degradados junto com seus receptores. O LDL é degradado depois que o colesterol associado tiver sido entregue a seu destino, mas seu receptor é reciclado (veja Fig. 21-40).

A endocitose mediada por receptores é explorada por algumas toxinas e vírus para entrar nas células. A toxina diftérica, a toxina da cólera e o vírus da influenza, todos entram nas células dessa forma (veja Fig. 12-21, pág. 315).

A degradação protéica em todas as células é mediada por sistemas especializados

A degradação de proteínas impede a construção de proteínas anormais ou indesejadas e permite a reciclagem de aminoácidos. A vida média das proteínas eucarióticas varia de 30 segundos a muitos dias. A maioria das proteínas é degradada rapidamente em relação à vida média de uma célula, embora algumas (como a hemoglobina) possam durar por toda a vida de uma célula (cerca de 110 dias para um eritrócito). As proteínas rapidamente degradadas incluem aquelas que são defeituosas, pela inserção incorreta de aminoácidos ou por causa da lesão acumulada durante o funcionamento normal. Também enzimas que agem em pontos-chave de regulação nas vias metabólicas com freqüência degradam rapidamente.

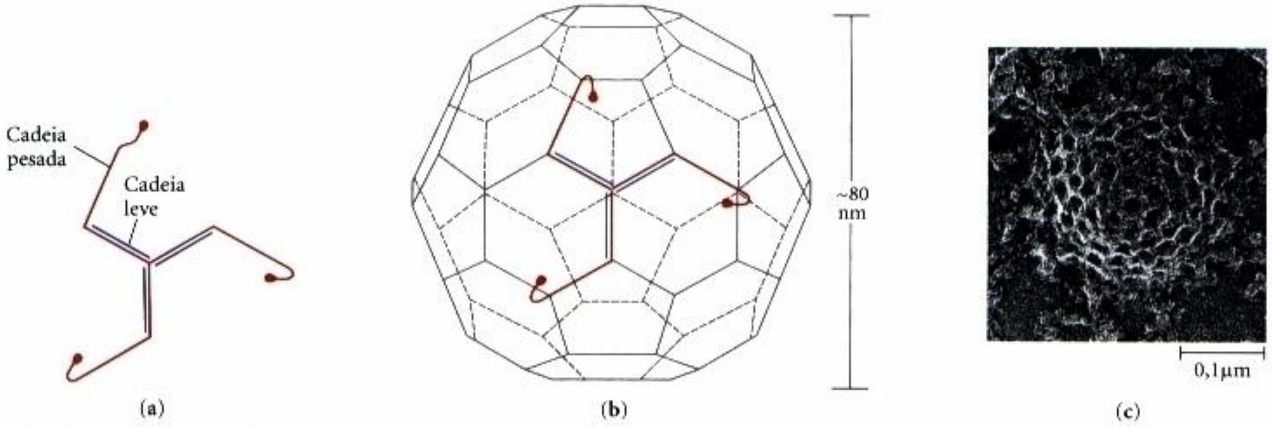


Figura 27-43 – Clatrina. (**a**) Três cadeias leves (L; M_r 35.000) e três cadeias pesadas (H; M_r 180.000) da unidade clatrina $(HL)_3$, organizadas como uma estrutura de três pernas chamada de trísceles. (**b**) As trísceles têm propensão a se montar em treliças poliédricas. (**c**) Eletromicrografia de uma depressão revestida na face citosólica da membrana plasmática de um fibroblasto.

Proteínas defeituosas, e aquelas com meias-vidas caracteristicamente curtas, são geralmente degradadas tanto em células bacterianas quanto em eucarióticas, por sistemas citosólicos dependentes de ATP. Um segundo sistema nos vertebrados, operando nos lisossomos, recicla os aminoácidos das proteínas de membrana, proteínas extracelulares e proteínas com meias-vidas caracteristicamente longas.

Na *E. coli*, muitas proteínas são degradadas por uma protease dependente de ATP, chamada de Lon (o nome se refere à "forma longa" das proteínas, observadas apenas quando essa protease estiver ausente). A protease é ativada na presença de proteínas defeituosas ou daquelas destinadas para a degradação rápida; duas moléculas de ATP são hidrolisadas para cada ligação peptídica quebrada. A função molecular precisa da hidrólise do ATP durante a clivagem da ligação peptídica ainda não é clara. Assim que uma proteína é reduzida a pequenos peptídeos inativos, outra protease independente de ATP completa o processo degradativo.

A via dependente de ATP nas células eucarióticas é bem diferente, envolvendo a proteína **ubiquitina**, que ocorre em todo o reino eucariótico. Uma das proteínas mais conservadas, a ubiquitina (76 resíduos de aminoácidos), é essencialmente idêntica, mesmo em organismos tão diferentes quanto a levedura e o homem. A ubiquitina é covalentemente ligada às proteínas destinadas à destruição, por meio de uma via dependente de ATP, que envolve três enzimas separadas (E1, E2 e E3 na Fig. 27-44). A forma como a ubiquitinação endereça as proteínas para a proteólise ainda não é conhecida. O sistema proteolítico dependente de ATP nos eucariotos é um grande complexo ($M_r \geq 1 \times 10^6$), chamado de **proteossomo**. O modo de ação do componente proteásico do sistema e o papel do ATP estão sendo, agora, elucidados.

Embora todos os sinais que desencadeiam a ubiquitinação não sejam entendidos, um simples foi encontrado. Para muitas proteínas, a identidade do primeiro resíduo que permanece depois da remoção do resíduo aminoterminal Met, e qualquer outro processamento proteolítico pós-traducional da extremidade aminoterminal, tem uma profunda influência na vida média (Tabela 27-10). Esses sinais aminoterminais têm sido conservados durante bilhões de anos de evolução, e são os mesmos tanto no sistema de degradação de proteínas bacterianas quanto na via de ubiquitinação humana. Sinais mais complexos, como a seqüência de destruição, discutida no Capítulo 13 (pág. 368), estão também sendo identificados.

A proteólise dependente de ubiquitina é tão importante para a regulação dos processos celulares quanto a eliminação de proteínas defeituosas. Muitas proteínas requeridas em apenas uma etapa do ciclo celular eucariótico são rapidamente degradadas pela via dependente de ubiquitina, depois que sua função foi completada. A mesma via é requerida para o processamento e a apresentação de antígenos MHC da classe I (veja Fig. 7-20). A destruição da ciclina, dependente de ubiquitina, é crítica para a regulação do ciclo celular (veja Fig. 13-33b). Os componentes E2 e E3 da via da cascata da ubiquitinação (Fig. 27-44) são, de fato, duas grandes famílias de proteínas. Diferentes enzimas E2 e E3 exibem diferentes especificidades para as proteínas-alvo e, portanto, regulam processos celulares diferentes. Algumas enzimas E2 e E3 estão altamente localizadas em certos compartimentos celulares, refletindo uma função especializada. Em um ambiente em alteração, a degradação das proteínas é tão importante para a sobrevivência de uma célula quanto o processo de síntese de proteínas, e há, ainda, muito a ser aprendido sobre essas interessantes vias.

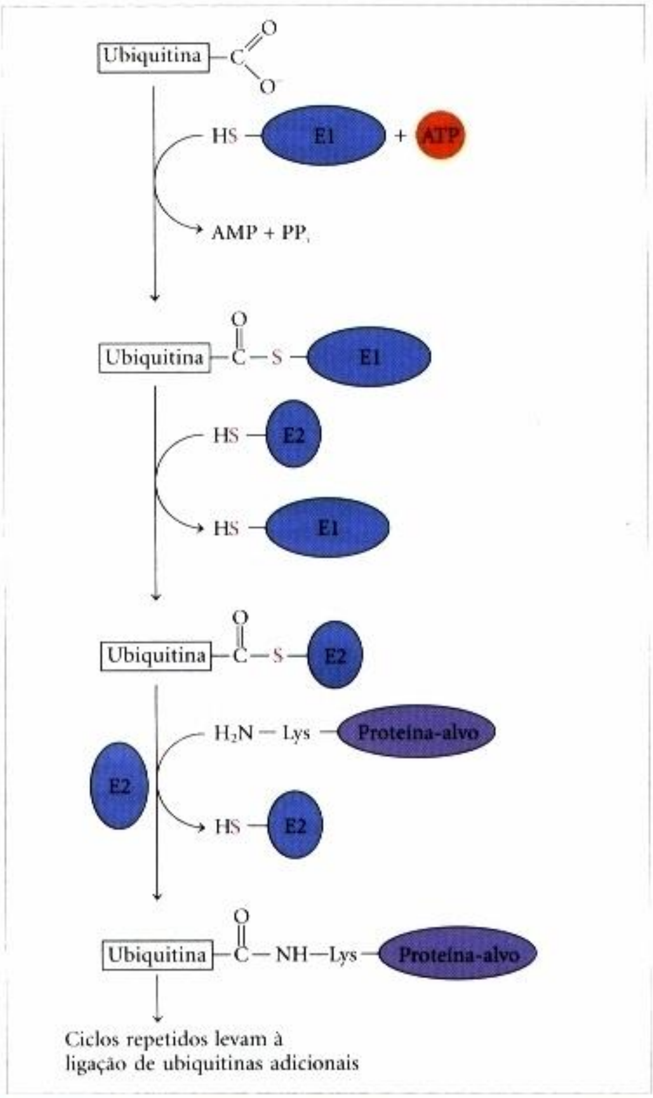


Figura 27-44 – O processo de três etapas pelo qual a ubiquitina é ligada a uma proteína. Dois intermediários enzima-ubiquitina diferentes são envolvidos. A carboxila livre do resíduo de glicina do carboxiterminal da ubiquitina é, no final, ligada por meio de uma ligação amida (isopeptidica) a um grupo ε-amino de um resíduo Lys da proteína-alvo. Ciclos adicionais produzem poliubiquitina, um polímero covalente das subunidades de ubiquitina, que endereça a proteina ligada para a destruição nos eucariotos.

Tabela 27-10 – Relações entre a meia-vida de uma proteina e seu aminoácido aminoterminal

Resíduo aminoterminal	Meia-vida*
Estabilizantes	
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	>20h
Desestabilizantes	
Ile, Gln	~30min
Tyr, Glu	~10min
Pro	~7min
Leu, Phe, Asp, Lys	~3min
Arg	~2min

Fonte: Modificado de Bachmair A, Finley D & Varshavsky A. (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its aminoterminal residue. *Science* **234**, 179-186.

*As meias-vidas foram medidas na levedura para uma única proteina que foi modificada, de forma que em cada experimento ela tinha um resíduo de aminoácido diferente no aminoterminal (veja, no Capítulo 29, técnicas usadas para construir proteinas com seqüências de aminoácidos alterados). As meias-vidas podem variar em proteinas diferentes e em organismos diferentes, mas esse padrão geral parece valer para todos os organismos: os aminoácidos, listados aqui como estabilizantes, quando presentes no aminoterminal, possuem um efeito estabilizante em todas as células.

Resumo

As proteínas são sintetizadas com uma seqüência específica de aminoácidos, por meio da tradução da informação codificada no RNA mensageiro, por um complexo de RNA-proteínas, chamado de ribossomo. Os aminoácidos são especificados por códons de mRNA, que consistem de trincas de nucleotídeos. A tradução requer moléculas adaptadoras, os tRNAs, que reconhecem códons e inserem aminoácidos em suas posições seqüenciais apropriadas no polipeptídeo.

As seqüências de base dos códons foram deduzidas de experimentos que usaram mRNAs sintéticos de composição e seqüência conhecidas. O código genético é degenerado: ele possui palavras-código múltiplas para aproximadamente todos os aminoácidos. A terceira posição em cada códon é muito menos específica do que a primeira e a segunda, e se diz que é oscilante. As palavras do código genético padrão são universais em todas as espécies, embora algumas divergências menores existam na mitocôndria e em alguns poucos organismos unicelulares.

O aminoácido iniciador, *N*-formilmetionina nas bactérias e metionina nos eucariotos, é codificado por AUG. O reconhecimento de um AUG específico, como o códon de iniciação, requer um sinal de iniciação rico em purina (a seqüência Shine-Dalgarno) do lado 5′ do AUG. As trincas UAA, UAG e UGA são sinais para terminação da tradução. A síntese das proteínas ocorre nos ribossomos. As bactérias possuem ribossomos 70S, com uma subunidade grande (50S) e uma subunidade menor (30S). Os ribossomos eucarióticos são significativamente maiores (80S) e contêm mais proteínas que os ribossomos bacterianos.

A síntese de proteínas ocorre em cinco etapas. Na etapa 1, os aminoácidos são ativados por aminoacil-tRNA sintetases específicas no citosol. Essas enzimas catalisam a formação de aminoacil-tRNAs, com a clivagem simultânea do ATP em AMP e PP_i. A fidelidade da síntese de proteínas depende da acuidade dessa reação, e algumas dessas enzimas desempenham etapas de revisão em sítios ativos separados.

Os RNAs de transferência possuem de 73 a 93 unidades nucleotídicas, algumas das quais possuem bases modificadas. Eles possuem um braço aminoácido com a seqüência terminal CCA(3′), ao qual um aminoácido é esterificado, um braço anticódon, um braço TψC e um braço D; alguns tRNAs possuem um quinto braço. O anticódon de um tRNA é responsável pela especificidade da interação entre o aminoacil-tRNA e o códon complementar do mRNA. O crescimento dos polipeptídeos nos ribossomos começa com o aminoácido aminoterminal e prossegue, por adições sucessivas de novos resíduos, até a extremidade carboxiterminal.

Nas bactérias, o aminoacil-tRNA iniciador, em todas as proteínas, é a *N*-formilmetionina-$tRNA^{fMet}$. A iniciação da síntese de proteínas (etapa 2) envolve a formação de um complexo entre a subunidade ribossômica 30S, o mRNA, o GTP, a fMet-$tRNA^{fMet}$, três fatores de iniciação e a subunidade 50S; o GTP é hidrolisado em GDP e P_i. Nas etapas de alongamento (etapa 3), o GTP e os fatores de alongamento são requeridos para a ligação do aminoacil-tRNA que chega ao sítio aminoacila do ribossomo. Na primeira reação de transferência peptídica, o resíduo fMet é transferido ao grupo amino do aminoacil-tRNA que chega. A movimentação do ribossomo ao longo do mRNA transloca, então, o dipeptidil-tRNA do sítio A para o sítio P, um processo que requer a hidrólise do GTP. Os tRNAs deacilados dissociam-se do sítio E ribossômico. Depois de muitos de tais ciclos de alongamento, a síntese da cadeia polipeptídica é terminada (etapa 4), com a ajuda de fatores de liberação. Pelo menos quatro ligações fosfato de alta energia são requeridas para gerar cada ligação peptídica, um investimento energético requerido para garantir a fidelidade da tradução.

Na etapa 5 da síntese de proteínas, os polipeptídeos enrolam-se em suas formas tridimensionais ativas. Muitas proteínas são ainda processadas por reações de modificações pós-traducionais.

Depois da síntese, muitas proteínas são direcionadas para localizações específicas da célula. Um mecanismo de endereçamento envolve uma seqüência sinalizadora peptídica, geralmente encontrada no aminoterminal de uma proteína recém-sintetizada. Nas células eucarióticas, uma classe dessas seqüências sinalizadoras é reconhecida e ligada por um complexo grande de proteína-RNA, chamado de partícula de reconhecimento da sinalização (SRP). A SRP liga-se à seqüência sinalizadora assim que ela aparece no ribossomo e transfere o ribossomo inteiro e o polipeptídeo incompleto ao retículo endoplasmático. Os polipeptídeos com essas seqüências sinalizadoras são movidos para a luz do retículo endoplasmático, à medida que são sintetizados; lá, eles podem ser modificados e transportados para o complexo de Golgi, e, então, selecionados e enviados aos lisossomos, à membrana plasmática, ou às vesículas transportadoras. Proteínas endereçadas às mitocôndrias e cloroplastos nas células eucarióticas e para a exportação nas bactérias também fazem uso de uma seqüência sinalizadora aminoterminal. Outros sinais de endereçamento conhecidos incluem carboidratos e características estruturais tridimensionais das proteínas chamadas de sinais embutidos. Algumas proteínas são importadas para dentro das células por endocitose, mediada por receptores. Esses receptores são, também, usados por algumas toxinas e vírus para ganhar acesso às células.

As proteínas são, eventualmente, degradadas por sistemas proteolíticos especializados, presentes em todas as células. Proteínas defeituosas e aquelas destinadas à rápida degradação são, geralmente, degradadas por um sistema proteolítico dependente de ATP. Nas células eucarióticas, as proteínas a serem quebradas por esse sistema são primeiro marcadas pela ligação de uma proteína altamente conservada, chamada de ubiquitina. A proteólise dependente de ubiquitina é crítica para a regulação de muitos processos celulares.

Leitura Adicional

O código genético

Cedergren R & Miramontes P. (1996) The puzzling origin of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 199-200.

Crick FHC. (1996) The genetic code: III. *Sci. Am.* **215** (October), 55-62.

Uma visão geral criteriosa do código genético, em uma época em que as palavras do código estavam começando a ser trabalhadas.

Fox TD. (1987) Natural variation in the genetic code. *Annu. Rev. Genet.* **21**, 67-91.

Hatfield D & Oroszlan S. (1990) The *where, what* and *how* of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 186-190.

Nirenberg MW. (1963) The genetic code: II. *Sci. Am.* **208** (March), 80-94.

Uma descrição dos experimentos originais.

Stadtman TC. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 83-100.

Stuart K. (1991) RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 68-72.

Síntese de proteínas

Arnez JG & Moras D. (1997) Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 211-216.

Björk GR, Ericson JU, Gustafsson CED, Hagervall TG, Jönsson YH, & Wikström PM. (1987) Transfer RNA modification. *Annu Rev. Biochem.* **56**, 263-288.

Burbaum JJ & Schimmel P. (1991) Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* **266**, 16.965-16.968.

Chapeville F, Lipmann F, von Ehrenstein G, Weisblum B, Ray WJJr, & Benzer S. (1962) On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1086-1092.

Experimentos clássicos, fornecendo provas para a hipótese do adaptador do Crick e mostrando que os aminoácidos não são controlados depois que eles são unidos ao RNAs.

Dintzis HM. (1961) Assembly of the peptide chains of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 247-261.

Um experimento clássico, que estabelece que as proteínas são montadas começando pelo aminoterminal.

Giege R, Sissler M, & Florentz C. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5017-5035.

Gingras A-C, Raught B, & Sonenberg N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913-964.

Gray NK, & Wickens M. (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 399-458.

Green R & Noller JF. (1997) Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 679-716.

Maden BEH. (1990) The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **39**, 241-303.

Moore PB. (1998) The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 35-58.

Sachs AB, Sarnow P, & Hentze MW. (1997) Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**, 831-838.

Schimmel P. (1993) GTP hydrolysis in protein synthesis: two for Tu? *Science* **259**, 1264-1265.

Sprinzl M. (1994) Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 245-250.

Stark H, Orlova EV, Rinke-Appel J, Jünke N, Mueller F, Brimacombe R & van Heel M. (1997) Arrangement of RNAs in pre and post-translocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopic. *Cell* **88**, 19-28.

Endereçamento de proteínas e secreção

Görlich D & Mattaj IW. (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**, 1513-1518.

Neupert W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863-917.

Pryer NK, Wuestehube LJ, & Schekman R. (1992) Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 471-516.

Rapoport TA, Jungnickel B, & Kutay U. (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 271-303.

Schatz G & Dobberstein B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-1525.

Schekman R & Orci L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1532.

Schmid SL. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 511-548.

Varshavsky A. (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 383-387.

Voges D, Zwickl P, & Baumeister W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1057.

Ward WHJ. (1987) Diphtheria toxin: a novel cytocidal enzyme. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 28-31.

Problemas

1. **Tradução do RNA mensageiro.** Prediga as seqüências de aminoácidos dos peptídeos formados pelos ribossomos, em resposta às seguintes seqüências de mRNAs, assumindo que a janela de leitura começa com as três primeiras bases em cada seqüência.

   (a) GGUCAGUCGCUCCUGAUU
   (b) UUGGAUGCGCCAUAAUUUGCU
   (c) CAUGAUGCCUGUUGCUAC
   (d) AUGGACGAA

2. **Quantas seqüências de mRNAs diferentes podem especificar uma seqüência de aminoácidos?** Escreva todas as possíveis seqüências de mRNA que podem codificar o segmento tripeptídeo simples Leu–Met–Tyr. A sua resposta lhe dará uma idéia do número de possíveis mRNAs que podem codificar um polipeptídeo.

3. **A seqüência de base de um mRNA pode ser predita a partir da seqüência de aminoácidos do seu produto poli-**

peptídico? Uma dada seqüência de bases em um mRNA codificará uma, e apenas uma, seqüência de aminoácidos em um polipeptídeo, se a janela de leitura for especificada. A partir de uma dada seqüência de resíduos de aminoácidos em uma proteína como o citocromo *c*, podemos predizer a seqüência de base do único mRNA que o codificou? *Justifique sua resposta.*

4. Codificação de um polipeptídeo por um DNA dúplex. A fita molde de uma amostra de DNA dupla hélice contém a seqüência

(5')CTTAACACCCCTGACTTCGCGCCGTCG

(a) Qual é a seqüência de bases do mRNA que pode ser transcrita a partir dessa fita?

(b) Qual seqüência de aminoácidos poderia ser codificada pelo mRNA em (a), começando a partir da extremidade 5'?

(c) Se a fita complementar desse DNA fosse transcrita e traduzida, a seqüência de aminoácidos resultante seria igual à de (b)? Explique o significado biológico de sua resposta.

5. A metionina possui apenas um códon. A metionina é um de dois aminoácidos com apenas um códon. Como o códon único da metionina pode especificar tanto o resíduo iniciador quanto os resíduos internos de Met dos polipeptídeos sintetizados pela *E. coli?*

6. mRNAs sintéticos. O código genético foi elucidado com polirribonucleotídeos sintetizados ou enzimática ou quimicamente no laboratório. Considerando o que você agora sabe sobre o código genético, como você sintetizaria um polirribonucleotídeo que poderia funcionar como um mRNA que codifica predominantemente muitos resíduos de Phe e um pequeno número de resíduos de Leu e Ser? Que outros aminoácidos seriam codificados por esse polirribonucleotídeo, mas em menores quantidades?

7. O custo energético da biossíntese de proteínas. Determine o custo energético mínimo, em termos de gastos de grupos fosfato de alta energia, requerido para a biossíntese da cadeia β da globina da hemoglobina (146 resíduos), começando por uma mistura que inclui todos os aminoácidos necessários, ATP e GTP. Compare a sua resposta com o custo energético direto da biossíntese de uma cadeia linear de glicogênio de 146 resíduos de glicose, em uma ligação (α1→4), começando de uma mistura que inclui glicose, UTP e ATP (Capítulo 20). A partir de seus dados, qual é o custo energético *extra* ao se fazer uma proteína na qual todos os resíduos são ordenados em uma seqüência específica, em comparação ao custo ao se fazer um polissacarídeo que contém o mesmo número de resíduos, mas não possui o conteúdo informacional da proteína?

Em adição ao custo energético direto para a síntese de uma proteína, há custos energéticos indiretos — aqueles requeridos para a célula fazer as enzimas necessárias para a síntese protéica. Compare a grandeza dos custos indiretos, para uma célula eucariótica, da biossíntese das cadeias lineares de glicogênio (α1→4) e da biossíntese dos polipeptídeos, em termos da maquinaria enzimática envolvida.

8. Predizendo os anticódons a partir dos códons. A maioria dos aminoácidos possui mais de um códon e se liga a mais de um tRNA, cada um com um anticódon diferente. Escreva todos os anticódons possíveis para os quatro códons da glicina: (5')GGU, GGC, GGA e GGG.

(a) A partir de sua resposta, quais posições nos anticódons são determinantes primários da especificidade do códon nesse caso da glicina?

(b) Quais desses pareamentos anticódon-códon possuem um par de bases oscilante?

(c) Em quais pareamentos anticódon-códon todas as três posições exibem fortes pontes de hidrogênio do tipo Watson-Crick?

9. O efeito de alterações de uma única base na seqüência de aminoácidos. Uma evidência confirmatória muito importante do código genético surgiu da natureza de alterações de um único resíduo na seqüência de aminoácidos das proteínas mutantes. Quais das substituições nos resíduos únicos dos aminoácidos abaixo estariam de acordo com o código genético? Quais não poderiam ser resultado de mutações em uma única base? Por quê?

(a) Phe → Leu
(b) Lys → Ala
(c) Ala → Thr
(d) Phe → Lys
(e) Ile → Leu
(f) His → Glu
(g) Pro → Ser

10. A base da mutação da célula falciforme. A hemoglobina falciforme possui um resíduo de Val na posição 6 da cadeia β da globina, em vez do resíduo Glu encontrado nessa posição na hemoglobina normal A. Você pode predizer que alteração ocorreu no códon do glutamato no DNA para explicar a sua substituição pela valina?

11. Importância do segundo código genético. Algumas aminoacil-tRNA sintetases não reconhecem nem se ligam ao anticódon de seus tRNAs, mas, ao contrário, usam outras características estruturais dos tRNAs para conferir a especificidade de ligação. Os tRNAs da alanina aparentemente caem nessa categoria.

(a) Quais características do $tRNA^{Ala}$ são reconhecidas pela Ala-tRNA sintetase?

(b) Descreva as conseqüências de uma mutação C→G na terceira posição do anticódon do $tRNA^{Ala}$.

(c) Que outras espécies de mutação poderiam ter efeitos semelhantes?

(d) Mutações dessas espécies nunca são encontradas na população natural de qualquer organismo. Por quê? (Indicação: considere o que poderia acontecer tanto para as proteínas individuais quanto para o organismo como um todo.)

12. Mantendo a fidelidade da síntese de proteínas. Os mecanismos químicos usados para evitar erros na síntese de proteínas são diferentes daqueles usados durante a replicação do DNA. As DNA polimerases utilizam a atividade revisora de uma exonuclease 3'→5' para remover nucleotídeos incorretamente pareados inseridos em uma fita de DNA em crescimento. Não há uma função revisora análoga nos ribossomos; e, de fato, a identidade dos aminoácidos ligados aos tRNAs que chegam e são adicionados ao polipeptídeo em crescimento nunca é verificada. Uma etapa de revisão que hidrolisasse a última ligação peptídica, formada quando um aminoácido incorreto fosse inserido em um polipeptídeo em crescimento (análogo à etapa revisora da DNA polimerase), seria quimicamente impraticável. Por quê? (Indicação: considere que a união entre o polipeptídeo em crescimento e o mRNA é mantida durante a fase de alongamento da síntese das proteínas; veja Figs. 27-26 e 27-27.)

13. Predizendo a localização celular de uma proteína. O gene para um polipeptídeo eucariótico de 300 resíduos de aminoácidos de comprimento é alterado de forma que uma seqüência sinalizadora, reconhecida pela SRP, ocorre no aminoterminal do polipeptídeo e um sinal de localização nuclear (NLS) ocorre internamente, começando no resíduo 150. Onde se espera que a proteína seja encontrada na célula?

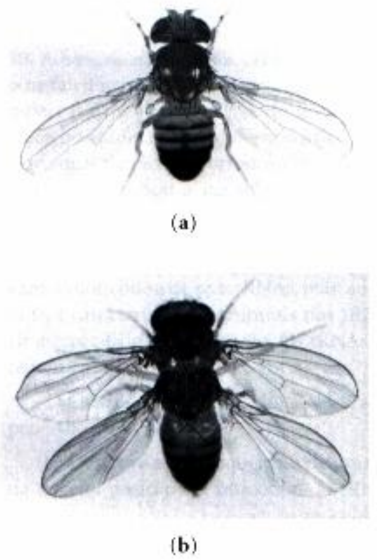
14. Requerimentos para a translocação da proteína através de uma membrana. A proteína bacteriana OmpA secretada possui um precursor, ProOmpA, que tem a seqüência sinalizadora aminoterminal requerida para a secreção. Se a ProOmpA purificada for desnaturada com uréia 8M e a uréia for, então, removida (por exemplo, passando a solução de proteína rapidamente através de uma coluna de filtração), a proteína pode ser translocada através de membranas internas bacterianas isoladas *in vitro*. Entretanto, a translocação torna-se impossível se for permitido à ProOmpA incubar por algumas horas na ausência da uréia. Além disso, a capacidade para a translocação é mantida por um período prolongado, se a ProOmpA for incubada na presença de uma outra proteína bacteriana, chamada de fator de desencadeamento. Descreva a provável função desse fator.

15. **Capacidade codificadora de proteína de um DNA viral**. O genoma de 5.386 pares de bases do bacteriófago ϕX174 (veja Fig. 27-10) inclui os genes para 10 proteínas, designadas de A a K, com tamanhos mostrados na tabela a seguir. Quanto DNA seria requerido para codificar essas proteínas? Como você poderia reconciliar o tamanho do genoma do ϕX174 com sua capacidade codificadora de proteína?

Proteína	Número de resíduos de aminoácidos
A	455
B	120
C	86
D	152
E	91
F	427
G	175
H	328
J	38
K	56

CAPÍTULO 28

Regulação da Expressão Gênica



Defeitos na regulação da expressão gênica podem alterar o programa do desenvolvimento de um organismo. Um exemplo é esta mutante *bitórax* da *Drosophila melanogaster* com um conjunto extra de asas. (a) Estrutura do corpo normal. (**b**) Mutante homeótica (*bitórax*) na qual um segmento se desenvolveu incorretamente para produzir um conjunto extra de asas.

Apenas uma fração dos 4.000 genes de um genoma bacteriano típico ou dos 100.000 genes estimados do genoma humano é expressa num dado tempo. Alguns produtos gênicos estão presentes em quantidades muito grandes nas células: os fatores de alongamento necessários para a síntese de proteínas, por exemplo, estão entre as proteínas mais abundantes da bactéria, e a ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) das plantas e bactérias fotossintetizantes é a enzima conhecida mais abundante na biosfera. Outros produtos gênicos são necessários em quantidades muito menores; por exemplo, uma célula pode conter apenas poucas moléculas das enzimas que reparam lesões raras no DNA. As necessidades para um certo produto gênico podem também se alterar com o tempo. A necessidade das enzimas, em certas vias metabólicas, pode crescer ou diminuir, à medida que as fontes de alimentos se alteram ou se esgotam. Durante o desenvolvimento de um organismo multicelular, algumas proteínas que influenciam a diferenciação celular estão presentes apenas por um tempo curto e num pequeno subconjunto das células de um organismo. A especialização da função celular pode afetar dramaticamente a necessidade de vários produtos gênicos; um exemplo é a inusitada alta concentração da hemoglobina nos eritrócitos. Dado ao alto custo da síntese de proteínas, a regulação da expressão gênica é essencial para a célula fazer o melhor uso da energia disponível.

A concentração celular de uma proteína é determinada por um delicado balanço de, pelo menos, sete processos, cada um possuindo vários pontos potenciais de regulação:

1. Síntese do transcrito primário do RNA.
2. Processamento pós-transcrição do mRNA.
3. Degradação do mRNA.
4. Síntese protéica (tradução).
5. Modificações pós-tradução das proteínas.
6. Degradação das proteínas.
7. Endereçamento e transporte de proteínas.

Esses processos estão resumidos na Figura 28-1. Examinamos vários desses mecanismos nos capítulos anteriores. A modificação pós-transcrição dos mRNAs por processos como padrões de emenda alternativa (veja Fig. 26-21b) ou a edição do RNA (veja Adendo 27-1) pode afetar quais proteínas serão produzidas de um transcrito de mRNA e em que quantidades. Uma variedade de seqüências de nucleotídeos pode afetar a velocidade pela qual um mRNA é degradado (pág. 793). Muitos fatores afetam a velocidade pela qual um mRNA é traduzido numa proteína, bem como influenciam a modificação pós-tradução, o endereçamento e finalmente a degradação dessa proteína (Capítulo 27).

Este capítulo focaliza principalmente a regulação da iniciação da transcrição, embora alguns aspectos da regulação da tradução sejam também descritos. Dos processos regulatórios ilustrados na Figura 28-1, aqueles operando no nível da iniciação da transcrição são os mais bem documentados e mais comuns. Como em todos os processos bioquímicos, o lugar mais eficiente para a regulação é o início da via. Entretanto, sintetizar macromoléculas informacionais é tão extraordinariamente caro que as células desenvolveram mecanismos elaborados para regular o processo. Os próprios processos regulatórios podem envolver um considerável investimento de energia química.

O controle da iniciação da transcrição permite a regulação sincronizada de genes múltiplos que codificam produtos com atividades interdependentes. Por exemplo, quando o seu DNA for intensamente lesado, as células bacterianas requerem um aumento coordenado no nível de muitas enzimas envolvidas no reparo do DNA. Talvez a forma de coordenação mais sofisticada ocorra nos circuitos reguladores complexos que guiam o desenvolvimento dos eucariotos multicelulares.

Começaremos pelo exame das interações entre as proteínas e o DNA, que são a chave para a regulação transcricional. Em seguida, discutiremos certas proteínas que regulam a expressão de genes específicos, primeiro entre as células procarióticas e depois nas eucarióticas. Incluídos na discussão estão vários mecanismos diferentes que permitem às células regularem a expressão gênica e coordenarem a expressão de genes múltiplos.

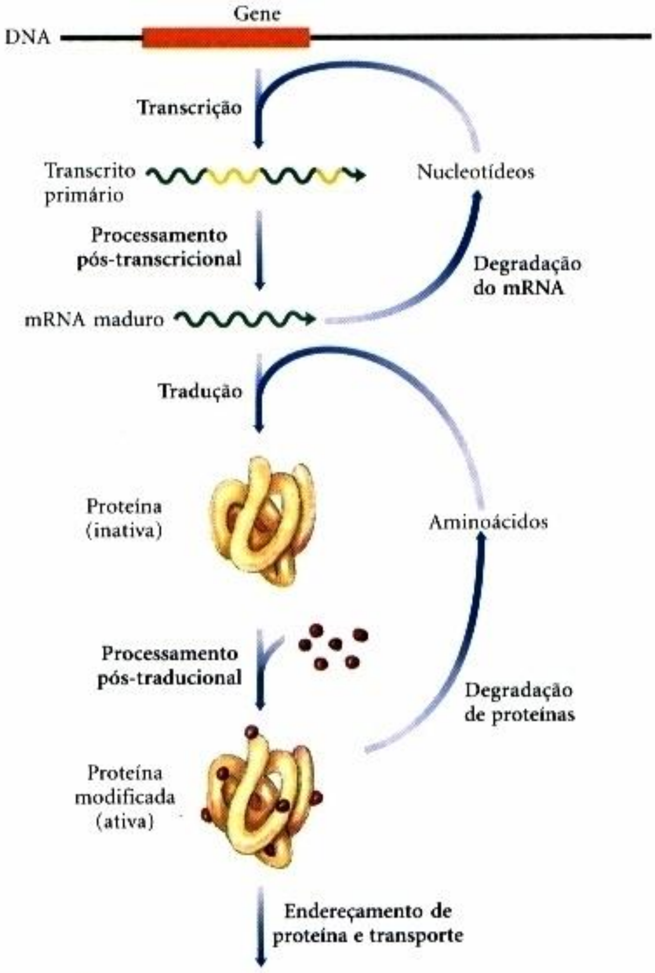


Figura 28-1 – Sete processos que afetam a concentração estacionária de uma proteína. Cada processo possui vários pontos de regulação potencial.

Princípios da Regulação Gênica

Genes para os produtos que são requeridos durante todo o tempo são expressos em níveis mais ou menos constantes em praticamente todas as células de uma espécie ou organismo. Genes para as enzimas das vias metabólicas centrais, tais como os do ciclo do ácido cítrico, estão nesta categoria e são freqüentemente referidos como genes da **economia doméstica.** A expressão invariável de um gene é chamada de **expressão gênica constitutiva.**

Os níveis celulares de alguns produtos gênicos se elevam e caem em resposta a sinais moleculares; esta é a **expressão gênica regulada.** Produtos gênicos que aumentam sua concentração sob circunstâncias moleculares particulares são referidos como **induzíveis,** e o processo de aumento da expressão do gene é chamado de **indução.** A expressão de muitos genes, que codificam as enzimas de reparo do DNA, por exemplo, é induzida em resposta aos altos níveis de lesão do DNA. Contrariamente, os produtos gênicos que diminuem sua concentração em resposta a um sinal molecular são referidos como **reprimíveis,** e o decréscimo na expressão gênica é chamado de **repressão.** Por exemplo, a presença de amplos suprimentos do aminoácido triptofano leva à repressão dos genes das enzimas que catalisam a biossíntese do triptofano na bactéria.

A transcrição é mediada e regulada por interações proteína-DNA, especialmente envolvendo os componentes da RNA polimerase (Capítulo 26). Consideraremos primeiramente como a atividade da RNA polimerase é regulada, e procederemos a uma descrição geral das proteínas que participam neste processo. Examinaremos, então, as bases moleculares para o reconhecimento das seqüências específicas do DNA por proteínas de ligação ao DNA.

A RNA polimerase liga-se ao DNA nos promotores

A RNA polimerase liga-se ao DNA e inicia a transcrição em sítios específicos do DNA, chamados de promotores (veja Fig. 26-5), geralmente encontrados próximos à posição onde começa a síntese do RNA no DNA molde. A regulação da iniciação da transcrição freqüentemente impõe alterações em como a RNA polimerase interage com um promotor.

As seqüências dos nucleotídeos dos promotores variam consideravelmente, influenciando a afinidade de ligação das RNA polimerases e, portanto, a freqüência da iniciação da transcrição. Alguns genes da *E. coli* são transcritos uma vez a cada segundo, outros menos de uma vez em cada geração celular. Muito dessa variação se deve simplesmente às diferenças nas seqüências dos promotores. Na ausência de proteínas reguladoras, diferenças nas seqüências de dois promotores podem afetar a freqüência da iniciação da transcrição por fatores de 1.000 ou mais vezes. A maioria dos promotores da *E. coli* possui uma seqüência próxima de um consenso (Fig. 28-2). Mutações que se afastam da seqüência consenso usualmente diminuem a função promotora; ao contrário, mutações que se aproximam ao consenso usualmente aumentam a função promotora.

Embora os genes da economia doméstica sejam expressos constitutivamente, as concentrações celulares das proteínas que eles codificam, entretanto, variam amplamente. Para esses genes, a interação RNA polimerase–promotor influencia fortemente a velocidade da iniciação da transcrição; diferenças nas seqüências do promotor permitem à célula sintetizar o nível apropriado de cada produto gênico da economia doméstica.

A taxa basal de iniciação da transcrição nos promotores dos genes que não são da economia doméstica é também determinada pela seqüência promotora, mas a expressão desses genes é, além disso, modulada pelas proteínas reguladoras. Estas proteínas freqüentemente agem aumentando ou interferindo na interação entre a RNA polimerase e o promotor.

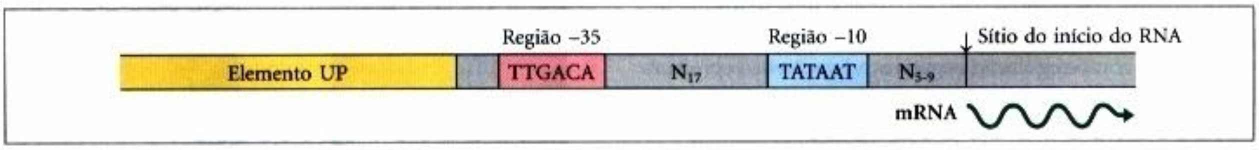


Figura 28-2 – Seqüência consenso para muitos promotores da *E. coli*. N indica qualquer nucleotídeo. A maioria das substituições de bases nas regiões –10 e –35 tem um efeito negativo na função promotora. Alguns promotores também incluem o elemento UP (veja Fig. 26-5). Por convenção, as seqüências de DNA são mostradas como se ocorressem na fita não-molde, com o terminal 5′ à esquerda. Os nucleotídeos são numerados a partir do sítio de início da transcrição, com números positivos para a direita (na direção da transcrição) e números negativos para a esquerda.

As seqüências dos promotores eucarióticos são mais variáveis do que a sua contrapartida procariótica (veja Fig. 26-8). As três RNA polimerases eucarióticas usualmente requerem um dispositivo de fatores de transcrição gerais a fim de se ligar a um promotor. Entretanto, da mesma forma que a expressão gênica procariótica, o nível basal da transcrição é determinado pelo efeito da seqüência do promotor na função da RNA polimerase e de seus fatores de transcrição associados.

A iniciação da transcrição é regulada por proteínas que se ligam aos promotores ou próximo a eles

Pelo menos, três tipos de proteínas regulam a iniciação da transcrição pela RNA polimerase: **fatores de especificidade** alteram a especificidade da RNA polimerase para um certo promotor ou conjunto de promotores; **repressores** impedem o acesso da RNA polimerase ao promotor; e **ativadores** aumentam a interação RNA-promotor.

Introduzimos os fatores de especificidade procarióticos no Capítulo 26 (veja Fig. 26-4), embora lá eles não tenham recebido esse nome. A subunidade σ da holoenzima da RNA polimerase da *E. coli* é um fator de especificidade que medeia o reconhecimento e a ligação ao promotor. A maioria dos promotores da *E. coli* é reconhecida por uma única subunidade σ (M_r 70.000), chamada de σ^{70}. Sob algumas condições, notavelmente quando as bactérias estão submetidas ao estresse térmico, algumas das subunidades σ^{70} são substituídas por outro fator de especificidade (M_r 32.000), chamado de σ^{32} (pág. 772). Quando ligada ao σ^{32}, a RNA polimerase é direcionada a um conjunto de promotores especializados com uma seqüência consenso diferente (Fig. 28-3). Esses promotores controlam a expressão de um conjunto de genes que codificam a resposta ao choque térmico. Dessa forma, por meio de alterações na afinidade de ligação da polimerase, que a direcionam a promotores diferentes, um conjunto de genes relacionados é regulado coordenadamente. Nas células eucarióticas, alguns dos fatores de transcrição gerais, em particular a proteína de ligação TATA, podem ser considerados fatores de especificidade.

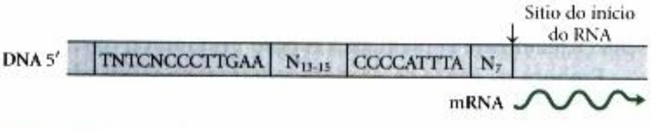


Figura 28-3 – Seqüência consenso para os promotores que regulam a expressão dos genes do choque térmico na *E. coli*. Este sistema responde ao aumento de temperatura, bem como a alguns outros estresses ambientais, e envolve a indução de um conjunto de proteínas. A ligação da RNA polimerase aos promotores do choque térmico é mediada por uma subunidade σ especializada da polimerase, σ^{32}, que substitui a σ^{70} no complexo de iniciação da RNA polimerase.

Os repressores ligam-se a sítios específicos no DNA. Nas células procarióticas, tais sítios de ligação, chamados de **operadores**, estão geralmente próximos a um promotor. A ligação da RNA polimerase, ou a sua movimentação ao longo do DNA após a ligação, é bloqueada quando o repressor estiver presente. A regulação por meio de uma proteína repressora que bloqueia a transcrição é referida como **regulação negativa**. A ligação do repressor ao DNA é regulada por um sinal molecular (algumas vezes, chamado de **efetor**), usualmente, uma pequena molécula ou uma proteína que se liga ao repressor e causa uma alteração conformacional. A interação entre o repressor e a molécula sinal pode levar tanto a um aumento quanto a uma diminuição na transcrição. Em alguns casos, a alteração conformacional resulta na dissociação de um repressor ligado ao operador no DNA (Fig. 28-4a). A iniciação da transcrição pode, então, prosseguir sem interrupções. Em outros casos, a interação entre um repressor inativo e a molécula sinal força o repressor a se ligar ao operador (Fig. 28-4b). Nas células eucarióticas, o sítio de ligação para um repressor pode estar um pouco distante do promotor; a ligação tem o mesmo efeito que nas células bacterianas: inibindo a montagem ou a atividade do complexo de transcrição no promotor.

Os ativadores fornecem um contraponto molecular aos repressores; eles ligam-se ao DNA e *aumentam* a atividade da RNA polimerase em um promotor — **regulação positiva.** Sítios de ligação dos ativadores estão freqüentemente adjacentes aos promotores que são ligados fracamente ou mesmo não ligados pela polimerase sozinha, de forma que pouca transcrição ocorre na ausência do ativador. Alguns ativadores eucarióticos ligam-se a sítios de DNA chamados de **intensificadores ("enhancers")** que estão bastante distantes do promotor, influenciando a taxa de transcrição em um promotor que pode estar localizado a milhares de pares de bases distante. Alguns ativadores estão normalmente ligados ao DNA, aumentando a transcrição até que a dissociação do ativador é desencadeada pela ligação de uma molécula sinalizadora (Fig. 28-4c). Em outros casos, o ativador se liga ao DNA apenas depois da interação com uma molécula sinalizadora (Fig. 28-4d). Moléculas sinalizadoras podem, portanto, aumentar ou diminuir a transcrição, dependendo de como elas afetam o ativador. A regulação positiva é particularmente comum nos eucariotos, e é mais complexa do que nos procariotos, como veremos.

A maioria dos genes procarióticos são regulados em unidades chamadas de operons

As bactérias possuem um mecanismo geral simples para a coordenação da regulação de genes que codificam produtos envolvidos num conjunto de processos relacionados: estes genes são agrupados no cromossomo e transcritos juntos. A maioria dos mRNAs procarióticos é policistrônico — genes múltiplos num único transcrito — e o promotor único que inicia a transcrição do agregado é o sítio de regulação para a expressão de todos estes genes. O agrupamento de genes e o promotor, mais as seqüências adicionais que funcionam juntas na regulação, são chamados de **operon** (Fig. 28-5). São comuns operons que incluam de 2 a 6 genes transcritos como uma unidade; alguns operons contêm 20 ou mais genes.

Muitos dos princípios da regulação da expressão gênica de procariotos foram primeiramente definidos por estudos da regulação do metabolismo da lactose na *E. coli*, que pode usar a lactose como fonte única de carbono. Em 1960, François Jacob e Jacques Monod publicaram um pequeno trabalho em *Proceedings of the French Academy of Sciences*, que descrevia como dois ge-

François Jacob

Jacques Monod

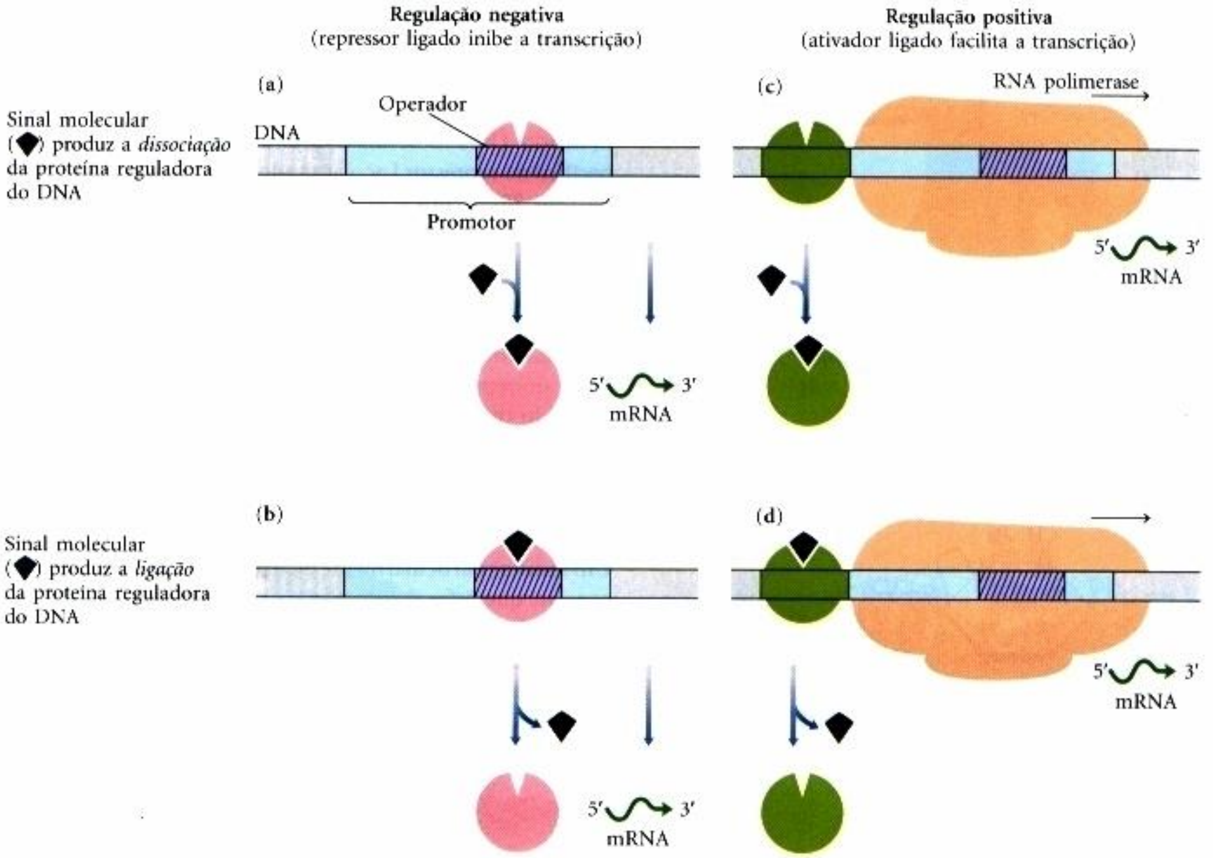
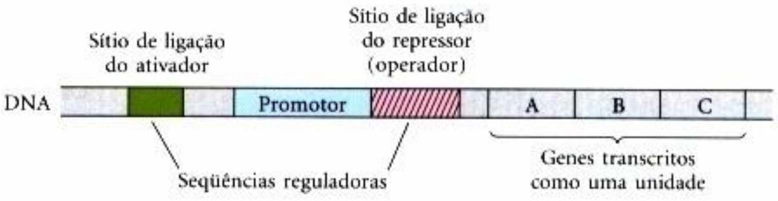

Regulação negativa
(repressor ligado inibe a transcrição)
Regulação positiva
(ativador ligado facilita a transcrição)
(a)
Operador
DNA
Promotor
Sinal molecular
(◆) produz a *dissociação*
da proteína reguladora
do DNA
5′ 3′
mRNA
(c)
RNA polimerase
5′ 3′
mRNA
(b)
Sinal molecular
(◆) produz a *ligação*
da proteína reguladora
do DNA
5′ 3′
mRNA
(d)
5′ 3′
mRNA

Figura 28-4 – Padrões comuns de regulação da iniciação da transcrição. Dois tipos de regulação negativas estão ilustrados. (**a**) O repressor (em vermelho) está ligado ao operador na ausência do sinal molecular; o sinal externo provoca a dissociação do repressor para permitir a transcrição. (**b**) O repressor está ligado na presença do sinal; o repressor dissocia-se e a transcrição ocorre quando o sinal for removido. A regulação positiva é mediada por genes ativadores. Novamente dois tipos são mostrados. (**c**) O ativador (em verde) liga-se na ausência do sinal molecular e a transcrição prossegue; quando o sinal é adicionado, o ativador dissocia-se e a transcrição é inibida. (**d**) O ativador liga-se na presença do sinal; ele dissocia-se apenas quando o sinal for removido. Observe que as regulações "negativa" e "positiva" são definidas pelo tipo da proteína reguladora envolvida: a proteína ligada ou facilita ou inibe a transcrição. Em qualquer caso, a adição do sinal molecular pode aumentar ou diminuir a transcrição, dependendo do seu efeito na proteína reguladora.

Figura 28-5 – Operon procariótico representativo. Os genes A, B e C são transcritos num mRNA policistrônico. Seqüências reguladoras típicas incluem os sítios de ligação para proteínas que ativam ou reprimem a transcrição a partir do promotor.


Sítio de ligação
do ativador
Sítio de ligação
do repressor
(operador)
DNA
Promotor
A
B
C
Seqüências reguladoras
Genes transcritos
como uma unidade

nes adjacentes, envolvidos no metabolismo da lactose, eram regulados coordenadamente por um elemento genético localizado numa extremidade do agregado de genes. Os genes eram aqueles para a β-galactosidase, que cliva a lactose em galactose e glicose, e a galactosídeo permease, que transporta a lactose para dentro da célula (Fig. 28-6). Os termos "operon" e "operador" foram introduzidos pela primeira vez nesse trabalho. Com o modelo do operon, a regulação gênica poderia, pela primeira vez, ser considerada em termos moleculares.

O operon *lac* está sujeito à regulação negativa

O operon da lactose (*lac*) (Fig. 28-7a) inclui os genes para a β-galactosidase (Z), a galactosídeo permease (Y) e a tiogalactosídeo transacetilase (A), cuja função fisiológica ainda é incerta. Cada um dos três genes é precedido por sítios de ligação de ribossomos (não mostrados na Fig. 28-7) que direcionam independentemente a tradução daquele gene (Capítulo 27). A regulação do operon *lac* segue o padrão resumido na Figura 28-4a.

O estudo de mutantes do operon *lac* revelou alguns detalhes do funcionamento do sistema regulatório dos operons. Na ausência da lactose, os genes do operon *lac* estão reprimidos. Mutações no operador ou em outro gene, o gene I, levam à síntese constitutiva dos produtos gênicos. Quando o gene I estiver defeituoso, a repressão pode ser restaurada introduzindo um gene funcional I na célula ou numa outra molécula de DNA, demonstrando que o gene I codifica uma molécula difusível que causa a repressão. Essa molécula provou ser uma proteína, agora chamada de repressor Lac, um tetrâmero de monômeros idênticos.

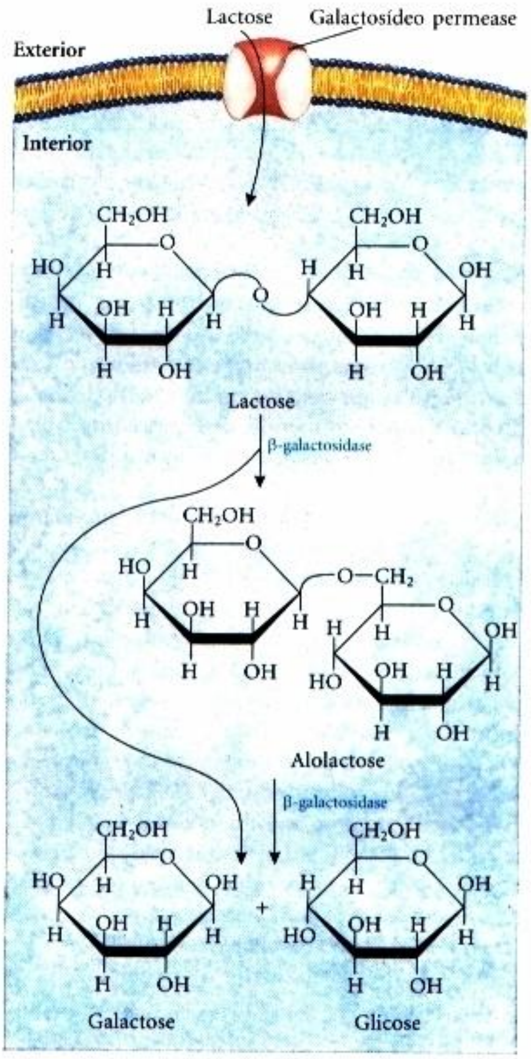


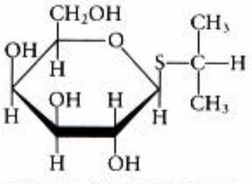
Figura 28-6 – O metabolismo da lactose na *E. coli*. A captação e o metabolismo da lactose requerem as atividades da galactosídeo permease e da β-galactosidase. A conversão da lactose em alolactose pela transglicosilação é uma reação menor também catalisada pela β-galactosidase.

O operador ao qual ele se liga mais fortemente (chamado de O_1) encontra-se ao lado do sítio de início da transcrição (Fig. 28-7a). O gene I é transcrito a partir do seu próprio promotor (P_I), independentemente dos genes do operon *lac*. O operon *lac* possui dois sítios de ligação secundários para o repressor Lac, algumas vezes referidos como pseudo-operadores, porque eles não são absolutamente requeridos para a função operadora. Um (O_2) está centrado próximo à posição +410, dentro do gene que codifica a β-galactosidase (Z); o outro (O_3) está próximo à posição –90, dentro do gene I. Para reprimir o operon, o repressor Lac parece ligar-se tanto ao operador principal e um dos sítios secundários, com o DNA interveniente, fazendo uma alça (Fig. 28-7b, c). Qualquer um dos arranjos de ligação bloqueia o início da transcrição.

Apesar desse elaborado complexo de ligação, a repressão não é absoluta. A ligação do repressor Lac reduz a velocidade da iniciação da transcrição por um fator de 1.000. Se os sítios O_2 e O_3 forem eliminados por deleção ou mutação, a ligação do repressor apenas ao sítio O_1 reduz a transcrição cerca de 100 vezes. Mesmo no estado reprimido, cada célula possui algumas moléculas da β-galactosidase e da galactosídeo permease, presumivelmente sintetizadas nas raras ocasiões em que o repressor dissocia-se transitoriamente dos operadores. Esse nível de transcrição basal é essencial para a regulação do operon.

Quando as células são providas com lactose, o operon *lac* é induzido. Uma molécula indutora (sinal) liga-se a um sítio específico no repressor Lac, causando uma mudança conformacional (Fig. 28-7d) que leva à dissociação do repressor do operador. O indutor no sistema do operon *lac* não é a própria lactose, mas sim um isômero da lactose chamado de alolactose (Fig. 28-6). Depois de entrar na célula da *E. coli* (por meio de moléculas de permease existentes), a lactose é convertida em alolactose por uma das poucas moléculas de β-galactosidase existentes. A liberação do repressor Lac, causada pela alolactose, permite que os genes do operon *lac* sejam expressos e leva a um aumento de 1.000 vezes na concentração da β-galactosidase.

Vários β-galactosídeos estruturalmente relacionados à alolactose são indutores do operon *lac*, mas não são substratos da β-galactosidase; outros são substratos, mas não são indutores. Um indutor particularmente efetivo e não metabolizável do operon *lac*, que é freqüentemente usado experimentalmente, é o isopropiltiogalactosídeo (IPTG). Um indutor que não consegue ser metabolizável permite aos pesquisadores explorarem a função fisiológica da lactose como fonte única de carbono para o crescimento, separada da sua função na regulação da expressão gênica.



Isopropiltiogalactosídeo
(IPTG)

Além de uma multidão de operons, agora conhecidos, nas bactérias, uns poucos operons policistrônicos foram encontrados em células de eucariotos inferiores. Nas células dos eucariotos superiores, entretanto, quase todos os genes são transcritos separadamente.

Os mecanismos pelos quais os operons são regulados podem variar significativamente do modelo simples apresentado na Figura 28-7. Mesmo o operon *lac* é mais complexo do que foi apresentado aqui, com um ativador também contribuindo para o esquema geral, como será descrito posteriormente neste capítulo. Antes de qualquer discussão sobre os níveis de regulação da expressão dos genes, examinaremos as interações moleculares críticas entre as proteínas ligantes do DNA (como repressores e ativadores) e as seqüências específicas no DNA as quais elas se ligam.

Proteínas reguladoras possuem domínios discretos de ligação ao DNA

Proteínas reguladoras geralmente ligam-se a seqüências específicas do DNA. Sua afinidade para essas seqüências-alvo é aproximadamente de 10^4 a 10^6 vezes maior do que sua afinidade para outras seqüências do DNA. A maioria das proteínas reguladoras possui domínios discretos de ligação ao DNA, contendo subestruturas que interagem íntima e especificamente com o DNA. Esses domínios de ligação usualmente incluem um ou mais, de um grupo relativamente pequeno de motivos estruturais característicos e reconhecidos.

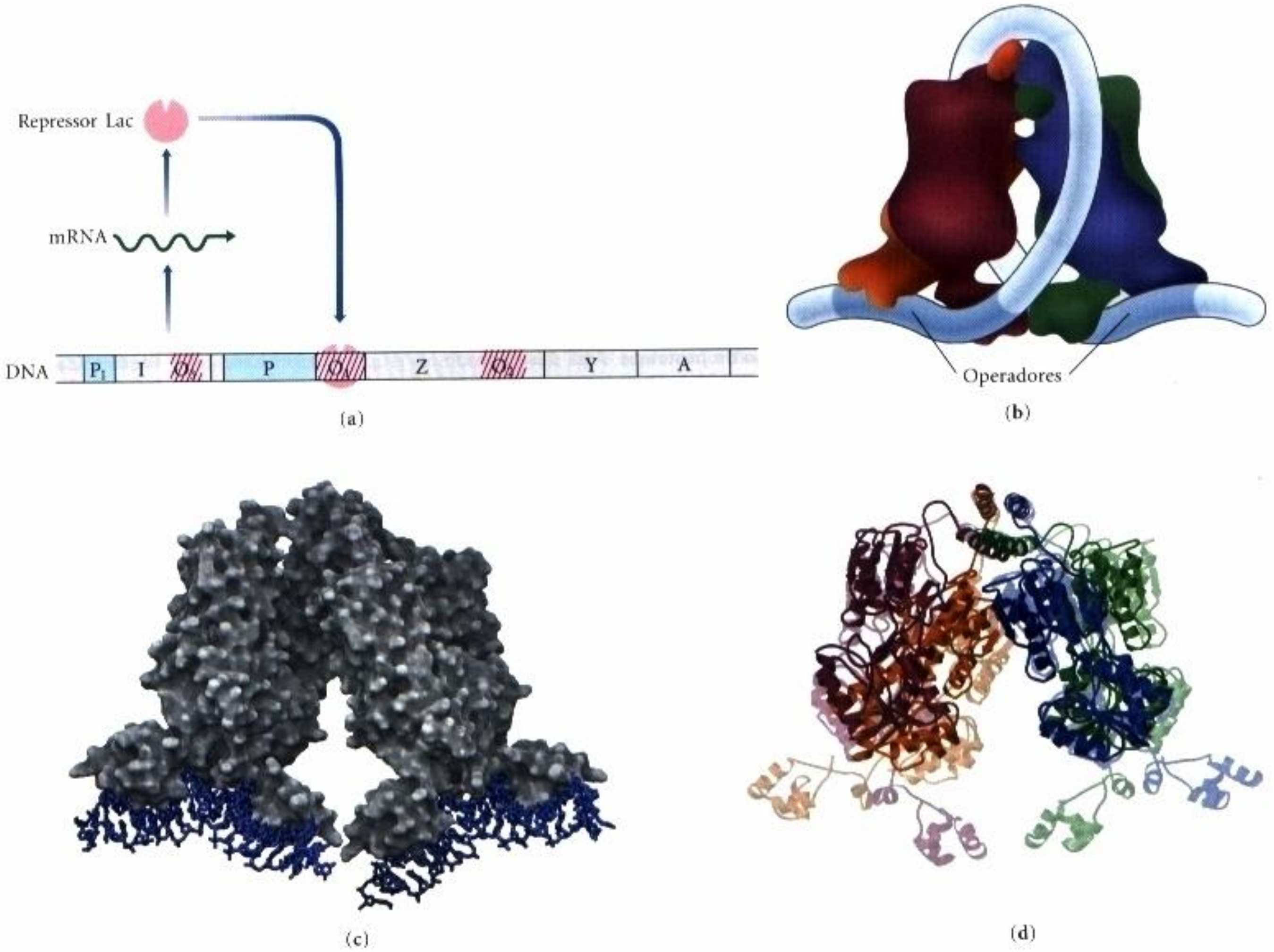


Figura 28-7 – O operon *lac*. (**a**) O operon *lac* no estado reprimido. O gene I codifica o repressor Lac. Os genes *lác* Z, Y e A codificam a β-galactosidase, a galactosídeo permease e a transacetilase, respectivamente. P é o promotor para os genes *lac*, e P_1 é o promotor para o gene I, O_1 é o operador principal para o operon lac; O_2 e O_3 são sítios operadores secundários chamados de pseudo-operadores. (**b**) O repressor Lac liga-se ao operador principal e a um dos pseudo-operadores, aparentemente formando uma alça no DNA que poderia cobrir o repressor, como mostrado. (**c**) O repressor Lac liga-se ao DNA. Esta figura mostra a proteína (cinza) ligada apenas a segmentos descontínuos e curtos de DNA (azul). (**d**) Alteração conformacional no repressor Lac causada pela ligação do indutor artificial isopropiltiogalactosídeo, IPTG. O repressor tetramérico é mostrado sem IPTG ligado (imagem transparente) e com o IPTG ligado (o IPTG ligado não é mostrado; cobriria a imagem sólida). O DNA ligado à estrutura transparente não está mostrado. Quando o IPTG estiver ligado e o DNA não estiver ligado, os domínios de ligação ao DNA não são mais definidos na estrutura do cristal.

Para ligar-se especificamente a seqüências de DNA, as proteínas reguladoras devem reconhecer características da superfície do DNA. A maioria dos grupos químicos que diferem entre as quatro bases e permitem a discriminação entre os pares de bases são os grupos doadores e aceptores de pontes de hidrogênio expostos no sulco principal do DNA (Fig. 28-8), e a maioria dos contatos proteínas-DNA que transmitem especificidade são pontes de hidrogênio. Uma notável exceção é a superfície não-polar próxima do C-5 das pirimidinas, onde a timina pode ser facilmente distinguida da citosina pelo seu grupo metil sobressalente. Os contatos proteína-DNA são também possíveis no sulco secundário do DNA, mas os padrões de pontes de hidrogênio aqui geralmente não permitem fácil discriminação entre os pares de bases.

Dentro das proteínas reguladoras, os resíduos de aminoácidos, cujas cadeias laterais mais freqüentemente fazem pontes de hidrogênio com as bases do DNA, são aqueles da Asn, Gln, Glu, Lys e Arg. Há um código de reconhecimento simples em que um aminoácido particular está sempre pareado com uma certa base? As duas pontes de hidrogênio que se podem formar entre a Gln ou Asn e as posições N^6 e N-7 da adenina não podem se formar com qualquer outra base. Um resíduo de Arg pode formar, semelhantemente, duas pontes de hidrogênio tanto com o N-7 e com o O^6 da guanina (Fig. 28-9).

O exame das estruturas de muitas proteínas ligantes do DNA tem mostrado, entretanto, que uma proteína pode reconhecer cada par de base de maneiras múltiplas, levando à conclusão que não existe nenhum código simples aminoácido-base. Para algumas proteínas, a interação Gln-adenina pode especificar pares de bases A═T, mas em outras uma cavidade de van der Waals para o grupo metila da timina pode reconhecer os pares de bases A═T. Os pesquisadores ainda não conseguem examinar a estrutura de uma proteína de ligação ao DNA e inferir a seqüência de DNA ao qual ela se liga.

Para interagir com bases no sulco principal do DNA, uma proteína requer uma estrutura relativamente pequena que pode se salientar estavelmente da superfície da proteína. O domínios de ligação ao DNA das proteínas reguladoras tendem a ser pequenos

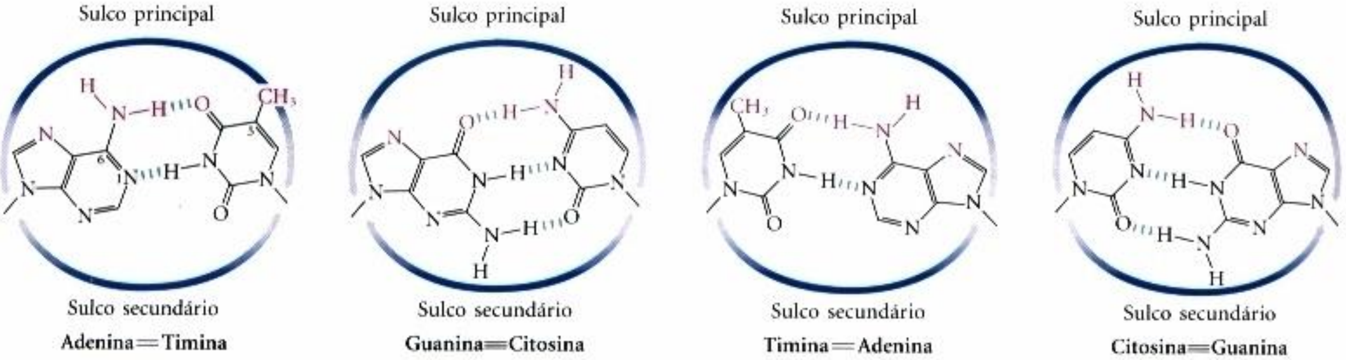


Figura 28-8 – Grupos no DNA disponíveis para a ligação de proteínas. Aqui são mostrados os grupos funcionais de todos os quatro pares de bases que são encontrados nos sulcos principal e secundário do DNA. Os grupos que podem ser usados para o reconhecimento dos pares de bases estão mostrados em vermelho.

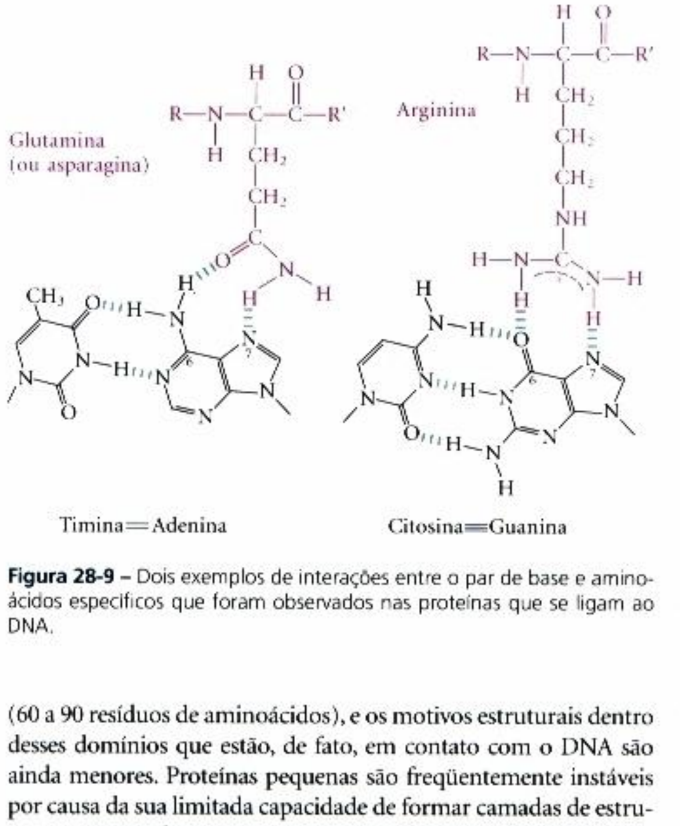


Figura 28-9 – Dois exemplos de interações entre o par de base e aminoácidos específicos que foram observados nas proteínas que se ligam ao DNA.

(60 a 90 resíduos de aminoácidos), e os motivos estruturais dentro desses domínios que estão, de fato, em contato com o DNA são ainda menores. Proteínas pequenas são freqüentemente instáveis por causa da sua limitada capacidade de formar camadas de estrutura para esconder grupos hidrofóbicos (Capítulo 6, veja pág. 124). Os motivos de ligação ao DNA fornecem uma estrutura estável muito compacta ou uma maneira para permitir que um segmento de proteína se saliente da superfície da proteína.

Os sítios de ligação do DNA para as proteínas reguladoras são freqüentemente repetições invertidas de uma seqüência curta de DNA (um palíndromo) na qual subunidades múltiplas (usualmente duas) de uma proteína reguladora ligam-se cooperativamente. O repressor Lac é pouco usual no sentido de que ele funciona como um tetrâmero, com dois dímeros mantidos juntos na extremidade distante dos sítios de ligação ao DNA (Fig. 28-7b). Uma célula da *E. coli* normalmente contém cerca de 20 tetrâmeros do repressor Lac. Cada um dos dímeros amarrados se liga separadamente a uma seqüência palindrômica do operador, em contato com 17 pares de bases de uma região com 22 pares no operon *lac* (Fig. 28-10). E cada um dos dímeros amarrados pode ligar-se independentemente a uma seqüência operadora com um deles, geralmente, ligando-se ao O_1 e o outro ao O_2 ou ao O_3 (como na Fig. 28-7b). A simetria da seqüência do operador O_1 corresponde ao eixo de simetria duplo dos dois pares de subunidades do repressor Lac. O repressor Lac tetramérico liga-se às suas seqüências operadoras com uma constante de dissociação *in vivo* de cerca de 10^{-10}M. O repressor discrimina entre operadores e outras seqüências por um fator de 10^6, de forma que a ligação a essas poucas bases entre os 4,7 milhões do cromossomo da *E. coli* é altamente específica.

Vários motivos de ligação ao DNA foram descritos, mas, aqui, focalizaremos dois que desempenham papéis principais na ligação ao DNA por proteínas reguladoras: o **hélice-volta-hélice** e o **dedo de zinco.** Consideraremos também um tipo de domínio de ligação ao DNA — o homeodomínio — encontrado em algumas proteínas eucarióticas.

Hélice-volta-hélice. Este motivo de ligação ao DNA é crucial para a interação de muitas proteínas reguladoras procarióticas, e motivos similares ocorrem em algumas proteínas reguladoras eucarióticas. O motivo hélice-volta-hélice engloba cerca de 20 aminoácidos em dois segmentos α-helicoidais de 7 a 9 resíduos de aminoácidos de comprimento, separados por uma volta do tipo β (Fig. 28-11). Esta estrutura, geralmente, não é estável por si; ela é simplesmente a porção reativa de um domínio de ligação maior ao DNA. Uma das duas α-hélices é chamada de hélice de reconhecimento, pelo fato de usualmente conter muitos dos aminoácidos que interagem com o DNA de uma maneira seqüência-específica. Esta α-hélice é empilhada em outros segmentos da estrutura da proteína de forma que se salienta da sua superfície. Quando ligada ao DNA, a hélice de reconhecimento é posicionada dentro ou próximo ao sulco principal. O repressor Lac possui esse motivo de ligação ao DNA (Fig. 28-11).

Dedo de zinco. Dedos de zinco consistem de cerca de 30 resíduos de aminoácidos; quatro dos quais (quatro Cys ou duas Cys e duas His) coordenam um único íon de Zn^{2+}. O próprio zinco não interage com o DNA; mais precisamente, a coordenação com o zinco estabiliza esse pequeno motivo estrutural. Várias cadeias laterais hidrofóbicas no núcleo da estrutura também proporcionam a estabilidade. A Figura 28-12 mostra a interação entre o DNA e três dedos de zinco de um polipeptídeo único da proteína reguladora Zif 268 de camundongo.

Dedos de zinco ocorrem em muitas proteínas eucarióticas de ligação ao DNA. A interação de um único dedo de zinco com o DNA é tipicamente fraca, e muitas proteínas de ligação ao DNA, como a Zif 268, possuem múltiplos dedos de zinco que aumentam substancialmente a ligação quando interagem simultaneamente com o DNA. Uma proteína de ligação ao DNA do sapo *Xenopus* possui 37 dedos de zinco. Há poucos exemplos conhecidos de motivos de dedos de zinco nas proteínas procarióticas.

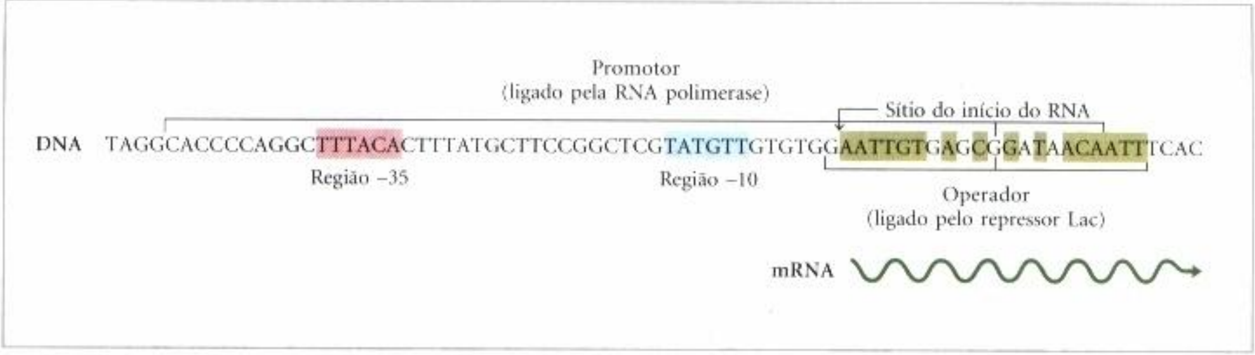

Promotor
(ligado pela RNA polimerase)
Sítio do início do RNA
DNA TAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCAC
Região −35
Região −10
Operador
(ligado pelo repressor Lac)
mRNA

Figura 28-10 – Relações entre a seqüência do operador *lac* e o promotor *lac*. As bases sombreadas em bege exibem simetria dupla (palindrômica) em volta do eixo indicado pela linha vertical.

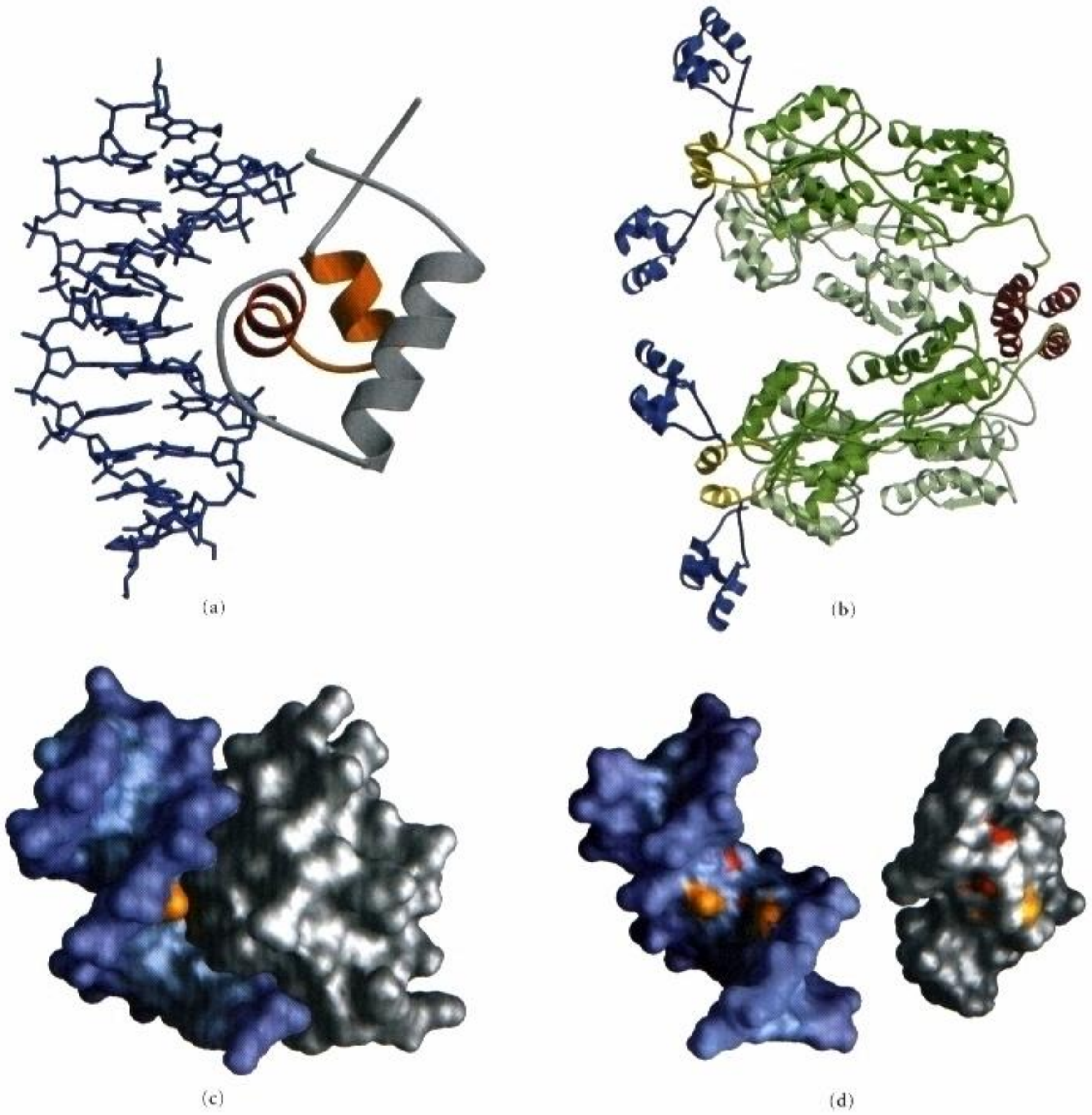


Figura 28-11 – Hélice-volta-hélice. (**a**) Domínio de ligação do repressor Lac, com o motivo hélice-volta-hélice mostrado em vermelho e laranja. A hélice de reconhecimento está em vermelho. (**b**) O repressor Lac inteiro, com os domínios de ligação em azul e as α-hélices envolvidas na tetramerização em vermelho. O restante da proteína (sombreada em verde) possui os sítios de ligação para a alolactose. Os domínios de ligação da alolactose estão ligados aos domínios de ligação ao DNA por meio de hélices de ligação (amarelo). (**c**) Imagem tridimensional da superfície do domínio de ligação ao DNA do repressor Lac (cinza) ligado ao DNA (azul). (**d**) O mesmo domínio de ligação ao DNA apresentado em (**c**), mas separado do DNA, mostrando as superfícies de interações da ligação. Alguns grupos na proteína e no DNA que interagem por meio de pontes de hidrogênio estão mostrados em vermelho; outros que interagem por meio de interações hidrofóbicas estão em laranja. Apenas alguns dos grupos envolvidos na seqüência de reconhecimento estão mostrados. A natureza complementar das duas superfícies é evidente.

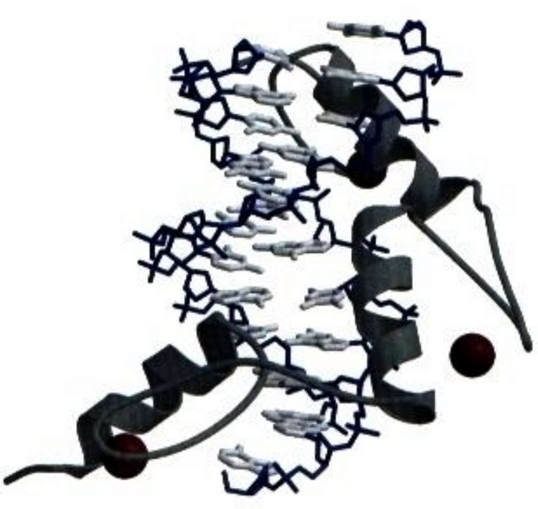


Figura 28-12 – **Dedos de zinco**. Três dedos de zinco (cinza) derivados da proteína reguladora Zif 268, complexados com o DNA (azul e branco). Cada Zn^{2+} (vinho) coordena dois resíduos de His e dois de Cys.

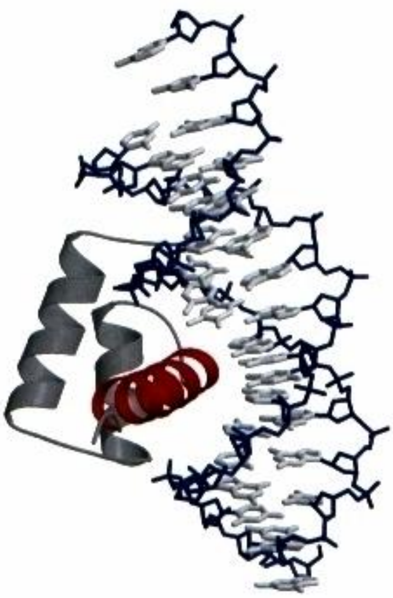


Figura 28-13 – **Homeodomínio**. Aqui está mostrado um homeodomínio ligado ao DNA. Uma das α-hélices, empilhadas em outras duas, pode ser vista projetando-se para dentro do sulco principal. Essa é apenas uma pequena parte da proteína Ultrabitórax (Ubx), envolvida na regulação do desenvolvimento na mosca das frutas.

A maneira precisa pela qual as proteínas que contêm dedos de zinco se ligam ao DNA varia de uma proteína para outra. Algumas vezes, os dedos de zinco contêm resíduos de aminoácidos que são importantes na discriminação da seqüência; em outras, parecem ligar-se ao DNA não especificamente (os resíduos de aminoácidos requeridos para a especificidade são encontrados em outro lugar na proteína). Os dedos de zinco também funcionam como motivos de ligação ao RNA — por exemplo, em certas proteínas que se ligam aos mRNAs e atuam como repressores traducionais. Este papel será discutido posteriormente neste capítulo.

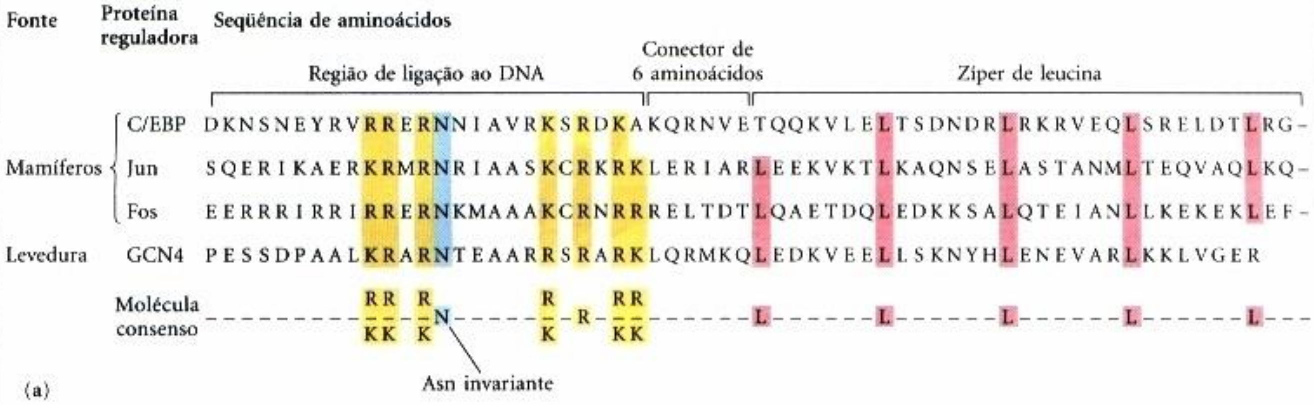
Homeodomínios. Um domínio de ligação ao DNA tem sido identificado em várias proteínas que funcionam como reguladores transcricionais, especialmente durante o desenvolvimento dos eucariotos. Este domínio de 60 aminoácidos — chamado de **homeodomínio**, porque foi descoberto nos genes homeóticos, genes que regulam o desenvolvimento da forma do corpo — é altamente conservado e tem sido identificado em proteínas de uma grande variedade de organismos, incluindo o homem (Fig. 28-13). O segmento de ligação ao DNA do domínio é relacionado ao motivo hélice-volta-hélice. A seqüência de DNA codificadora desse domínio é chamada de **seqüência homeo** (**"homeobox"**).

Proteínas reguladoras também possuem domínios de interação proteína-proteína

Proteínas reguladoras contêm domínios não apenas para a ligação ao DNA, mas também para as interações proteína-proteína — com a RNA polimerase, outras proteínas reguladoras, ou outras subunidades da mesma proteína reguladora. Exemplos incluem muitos fatores de transcrição eucarióticos que funcionam como ativadores gênicos, que freqüentemente se ligam ao DNA como dímeros, usando domínios de ligação ao DNA que contém dedos de zinco. Alguns domínios estruturais são dedicados às interações requeridas para a formação do dímero, que geralmente é um pré-requisito para a ligação ao DNA. Da mesma forma que os motivos de ligação ao DNA, os motivos estruturais que medeiam as interações proteína-proteína tendem a cair dentro de uma de algumas poucas categorias. Dois exemplos importantes são: **o zíper de leucina** e a **hélice-alça-hélice básica**. Motivos estruturais desse tipo são a base para classificar algumas proteínas reguladoras em famílias estruturais.

Zíper de leucina. Este motivo é uma α-hélice anfipática com uma série de aminoácidos hidrofóbicos concentrados num lado (Fig. 28-14), com a superfície hidrofóbica formando a área de contato entre os dois polipeptídeos do dímero. Uma característica impressionante destas α-hélices é a ocorrência de Leu a cada sete resíduos de aminoácidos, formando uma linha reta ao longo da superfície hidrofóbica. Embora os pesquisadores inicialmente pensassem os resíduos de Leu interdigitados (daí o nome de "zíper"), hoje sabemos que eles se alinham lado a lado e que as alças de α-hélice interactantes se espiralizam em volta da outra (formando uma espira espiralada; Fig. 28-14b). As proteínas reguladoras com zíperes de leucina freqüentemente possuem um domínio de ligação ao DNA separado com uma alta concentração de resíduos básicos (Lys ou Arg) que podem interagir com as cargas negativas dos fosfatos do esqueleto do DNA. Zíperes de leucina têm sido encontrados em muitas proteínas eucarióticas e em poucas procarióticas.

Hélice-alça-hélice básica. Um outro motivo estrutural comum ocorre nas proteínas reguladoras eucarióticas implicadas no controle da expressão gênica durante o desenvolvimento de organismos multicelulares. Essas proteínas compartilham uma região conservada de cerca de 50 resíduos de aminoácidos, importante tanto para a ligação ao DNA quanto para a dimerização protéica. Essa região pode formar duas α-hélices anfipáticas curtas unidas por uma "alça" de tamanho variável, a hélice-alça-hélice (distinta do motivo hélice-volta-hélice associado com a ligação ao DNA). Os motivos hélice-alça-hélice de dois polipeptídeos interagem para formar dímeros (Fig. 28-15). Nestas proteínas, a ligação ao DNA é mediada por uma seqüência adjacente e curta de aminoácidos rica em resíduos básicos, semelhante à região separada de ligação ao DNA nas proteínas contendo zíperes de leucina.


Fonte
Proteína reguladora
Seqüência de aminoácidos
Região de ligação ao DNA
Conector de 6 aminoácidos
Zíper de leucina
Mamíferos
C/EBP DKNSNEYRVRRERNNIAVRKSRDKAKQRNVETQQKVLELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRG-
Jun SQERIKAERKRMRNRIAASKCRKRKLERIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLTEQVAQLKQ-
Fos EERRRIRRIRRERNKMAAAKCRNRRRELTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEF-
Levedura
GCN4 PESSDPAALKRARNTEAARRSRARKLQRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER
Molécula consenso
RR/KK R/K N R/K R RR/KK L L L L L
Asn invariante
(a)

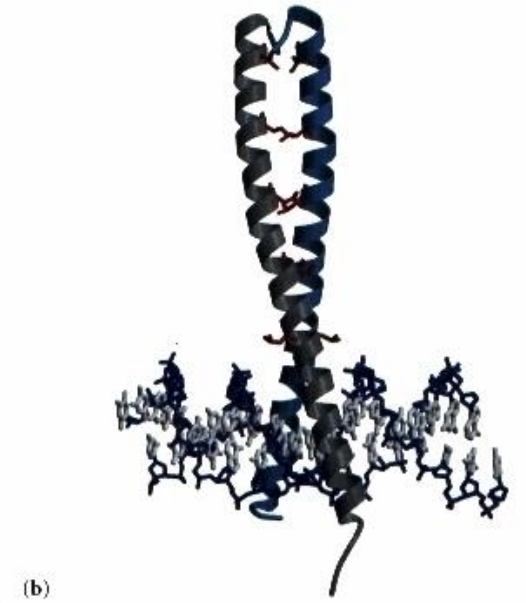


Figura 28-14 – Zíperes de leucina. (**a**) Comparação das seqüências de aminoácidos de várias proteínas com zíperes de leucina. Observe que os resíduos de Leu (L) ocorrem a cada sete resíduos na região do zíper, e o número dos resíduos Lys (K) e Arg (R) na região de ligação ao DNA. (**b**) Um zíper de leucina da proteína ativadora GCN4 da levedura. Apenas as α-hélices "ziperadas" (branco e azul-claro), derivadas das diferentes subunidades da proteína dimérica, estão mostradas. As duas hélices se enrolam em volta da outra numa espira delicadamente espiralada. Os resíduos de Leu interactantes estão mostrados em vermelho.

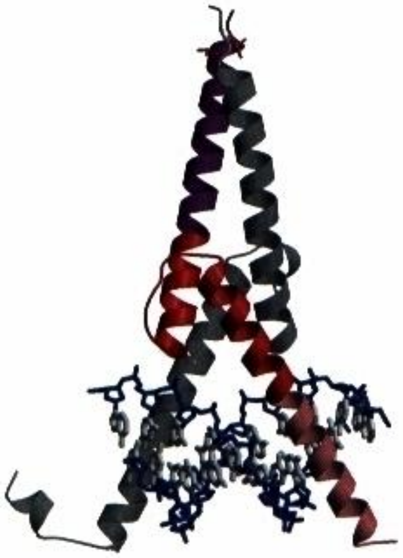


Figura 28-15 – Hélice-alça-hélice. Aqui está mostrado o fator de transcrição humano Max, ligado ao seu sítio-alvo de DNA. A proteína é dimérica, uma subunidade está colorida. O segmento de ligação ao DNA (rosa) emerge com a primeira hélice da hélice-alça-hélice (vermelho). A segunda hélice emerge com a extremidade carboxiterminal da subunidade (púrpura). A interação das hélices da carboxiterminal das duas subunidades descreve uma espira espiralada muito semelhante àquela do zíper de leucina (veja Fig. 28-14b), mas com apenas um par de interações de resíduos de Leu (cadeias laterais em vermelho próximas do topo) neste exemplo particular. A estrutura global é, algumas vezes, chamada de motivo hélice-alça-hélice/zíper de leucina.

Mistura de subunidades nas proteínas reguladoras eucarióticas. Várias famílias de fatores de transcrição eucarióticos foram definidas baseando-se numa íntima semelhança estrutural. Dentro de cada família, os dímeros podem se formar entre proteínas idênticas (um homodímero) ou entre dois membros diferentes da família (um heterodímero). Uma família hipotética de quatro proteínas de zíperes de leucina diferentes pode formar até 10 espécies diméricas diferentes. Em muitos casos, as diferentes combinações parecem ter propriedades funcionais e regulatórias diferentes.

Além dos domínios estruturais dedicados à ligação ao DNA e à dimerização (ou oligomerização), muitas proteínas reguladoras devem interagir com a RNA polimerase, com outras proteínas reguladoras não-relacionadas, ou com ambas. Pelo menos, três tipos diferentes de domínios adicionais para interação proteína-proteína têm sido caracterizados (principalmente em eucariotos): rico em glutamina; rico em prolina e em domínios acídicos, os nomes refletindo os resíduos de aminoácidos, que são especialmente abundantes.

As interações da ligação proteína-DNA são as bases dos intrincados circuitos regulatórios fundamentais para a função gênica. Voltaremos agora para uma descrição mais detalhada dos esquemas regulatórios, primeiro, nos procariotos, e depois, nos sistemas eucarióticos.

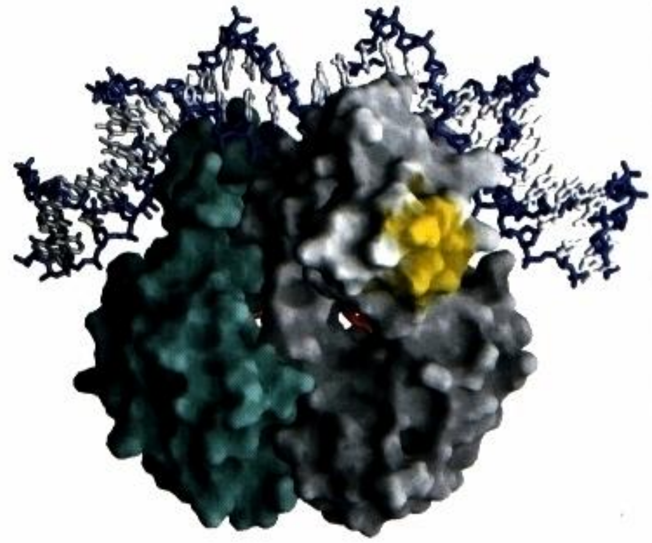


Figura 28-16 – Homodímero CRP. Moléculas de cAMP ligadas estão mostradas em vermelho. Observe a curvatura do DNA em volta da proteína. A região que interage com a RNA polimerase está sombreada em amarelo.

Regulação da Expressão Gênica nos Procariotos

Da mesma forma que em outras áreas da investigação bioquímica, o estudo da regulação da expressão gênica avançou primeiro e mais rápido nas bactérias do que em outros organismos experimentais. Os exemplos da regulação gênica bacteriana apresentados aqui são escolhidos entre sistemas bem estudados, em parte por causa do seu significado histórico, mas principalmente porque eles fornecem uma boa visão do alcance dos mecanismos regulatórios empregados nos procariotos. Muitos dos princípios da regulação gênica dos procariotos são também relevantes para o entendimento da regulação da expressão gênica nos eucariotos.

Começamos pelo exame dos operons da lactose, da arabinose e do triptofano. Cada sistema possui proteínas reguladoras, mas os mecanismos gerais da regulação são muito diferentes. Segue-se uma pequena discussão da resposta SOS na *E. coli*, ilustrando como genes espalhados através do genoma podem ser regulados coordenadamente. Descreveremos então dois sistemas procarióticos de tipos bem diferentes, ilustrando a diversidade dos mecanismos regulatórios dos genes: a regulação da síntese das proteínas ribossômicas no nível da tradução; com muitas das proteínas reguladoras ligando-se ao RNA (em vez do DNA), e a regulação de um processo chamado de variação da fase na *Salmonella* pela recombinação genética.

Primeiro, retornemos ao operon *lac* para examinar suas características com mais detalhes.

O operon *lac* está sujeito à regulação positiva

As interações operador-repressor-indutor, descritas anteriormente para o operon *lac* (Fig. 28-7), fornecem um modelo intuitivamente satisfatório, para uma mudança do tipo ligar/desligar, na regulação da expressão gênica. Na realidade, a regulação do operon raramente é tão simples. O ambiente de uma bactéria é muito complexo para os seus genes serem controlados por um único sinal. Outros fatores, além da lactose, afetam a expressão dos genes *lac*, como a disponibilidade de glicose. A glicose, metabolizada diretamente pela glicólise, é a fonte de energia preferida da *E. coli*. Outros açúcares podem funcionar como nutriente principal ou único, entretanto, etapas adicionais são requeridas para prepará-los para entrar na glicólise, necessitando a síntese de enzimas adicionais. Expressar genes para as proteínas que metabolizam açúcares, como a lactose ou arabinose, é um desperdício se a glicose for abundante.

O que acontece com a expressão do operon *lac* quando tanto a glicose quanto a lactose estiverem presentes? Um outro mecanismo regulador, chamado de **repressão catabólica**, previne a expressão dos genes para o catabolismo da lactose, arabinose e outros açúcares na presença de glicose, mesmo quando estes açúcares secundários estiverem também presentes. O efeito da glicose é mediado por cAMP e uma proteína chamada **proteína receptora do cAMP,** ou **CRP** ("*c*AMP *r*eceptor *p*rotein"; a proteína é, algumas vezes, chamada CAP — "*c*atabolite gene *a*ctivator *p*rotein"). Esse homodímero (subunidade M_r 22.000) possui sítios de ligação para o DNA e o cAMP. A ligação é mediada por um domínio hélice-volta-hélice dentro do domínio de ligação ao DNA da proteína (Fig. 28-16). Quando a glicose estiver ausente, a CRP liga-se a um sítio próximo ao promotor *lac* (Fig. 28-17a) e estimula 50 vezes a transcrição do RNA. A CRP é, portanto, um elemento regulador positivo que responde aos níveis da glicose, enquanto o repressor Lac é um elemento regulador negativo que responde à lactose. Os dois agem coordenadamente; a CRP tem pouco efeito no operon *lac* quando o repressor Lac está bloqueando a transcrição, e a dissociação do repressor do operador tem pouco efeito na transcrição do operon *lac*, a menos que a CRP esteja presente para facilitar a transcrição — quando a CRP não está ligada, o promotor *lac* do tipo selvagem é um promotor relativamente fraco (Fig. 28-17b). O complexo aberto da RNA polimerase e o promotor (veja Fig. 26-6) não se forma facilmente, a menos que a CRP esteja presente. A CRP interage diretamente com a RNA polimerase por meio da sua subunidade α (Fig. 28-16).

O efeito da glicose na CRP é mediado pelo cAMP (Fig. 28-18). A CRP possui um sítio de ligação ao cAMP, e ele se liga ao DNA mais avidamente quando a concentração do cAMP for alta.

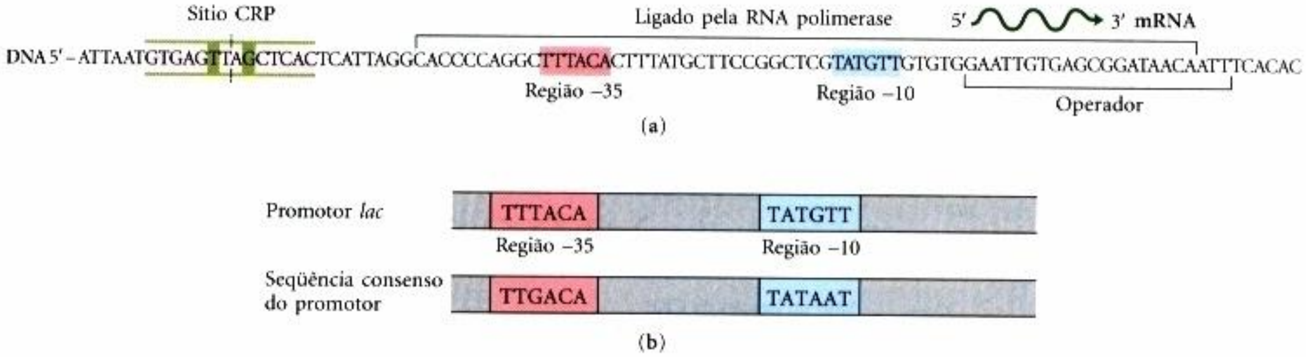

Sítio CRP
Ligado pela RNA polimerase
5'
3' mRNA
DNA 5' – ATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACAC
Região –35
Região –10
Operador
(a)
Promotor *lac*
TTTACA
TATGTT
Região –35
Região –10
Seqüência consenso do promotor
TTGACA
TATAAT
(b)

Figura 28-17 – Ativação da transcrição do operon *lac* pela CRP. (**a**) O sítio de ligação para a CRP está próximo do promotor. Como no caso do operador *lac*, o sítio da CRP possui simetria dupla (bases sombreadas em bege) em volta do eixo indicado pela linha interrompida. (**b**) Seqüência do promotor *lac* comparada com a seqüência consenso do promotor. As diferenças significam que a RNA polimerase se liga fracamente ao promotor *lac* até que a polimerase seja ativada pelo CRP.

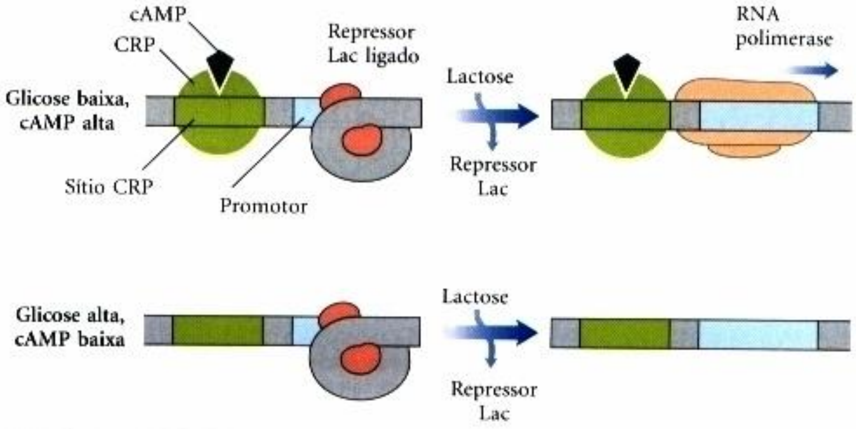

cAMP
CRP
Glicose baixa, cAMP alta
Sítio CRP
Promotor
Repressor Lac ligado
Lactose
Repressor Lac
RNA polimerase
Glicose alta, cAMP baixa
Lactose
Repressor Lac

Figura 28-18 – Efeitos combinados da glicose e da lactose na expressão do operon *lac*. A transcrição ocorre apenas quando as concentrações da glicose forem baixas (de forma que os níveis de cAMP sejam altos e a CRP esteja ligada) e as concentrações de lactose forem altas (de forma que o repressor Lac não esteja ligado).

Na presença da glicose, a concentração do cAMP é inibida e o efluxo do cAMP da célula é estimulado. À medida que [cAMP] declina, a ligação da CRP ao DNA cai, diminuindo, portanto, a expressão do operon *lac*. A indução forte do operon *lac*, portanto, requer tanto a presença da lactose (para inativar o repressor *lac*) quanto a diminuição da concentração de glicose (para desencadear um aumento na [cAMP] e aumentar a ligação do cAMP à CRP).

A CRP e o cAMP estão envolvidos na regulação coordenada de muitos operons, principalmente àqueles que codificam enzimas para o metabolismo de outros açúcares secundários, como a galactose e a arabinose. Uma rede de operons com um regulador comum é chamada de **regulon**. Este arranjo permite mudanças coordenadas nas funções celulares que podem envolver a ação de centenas de genes. Esse é um tema importante na regulação da expressão da rede de genes eucarióticos dispersos. Outros regulons bacterianos incluem o sistema gênico do choque térmico que responde a alterações na temperatura (pág. 848), e os genes que são induzidos na *E. coli* como parte da resposta SOS à lesão do DNA, descrita posteriormente.

O operon *ara* submete-se tanto à regulação positiva quanto à negativa por uma única proteína reguladora

Um esquema regulador mais complexo é encontrado no operon da arabinose (*ara*) da *E. coli*, um sistema que ilustra vários mecanismos regulatórios adicionais. Primeiro, a proteína reguladora AraC exerce tanto o controle positivo como o negativo. A ligação de uma molécula sinal altera a sua conformação de uma forma repressora, que se liga a uma seqüência reguladora do DNA, à sua forma ativadora, que se liga a uma seqüência diferente do DNA, com efeitos radicalmente diferentes. Segundo, a proteína AraC regula sua própria síntese pela repressão da transcrição do seu próprio gene, um fenômeno chamado de **autorregulação**. Finalmente, os efeitos de algumas seqüências reguladoras podem ser exercidos a distância, ou seja, essas seqüências nem sempre são contíguas com os promotores. Seqüências de DNA distantes podem ser colocadas próximas pela **formação de uma alça de DNA**, mediada por interações específicas proteína-proteína e proteína-DNA. A este respeito, o sistema *ara* é um modelo útil para a expressão gênica eucariótica, em que a regulação envolvendo sítios relativamente distantes no DNA é comum.

A *E. coli* pode usar a arabinose como uma fonte de carbono convertendo-a em xilulose-5-fosfato, um intermediário na via da pentose fosfato (veja Fig. 15-21). Essa conversão requer as enzimas ribulose quinase, arabinose isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase codificadas pelos genes *araB*, *araA* e *araD*, respectivamente (Fig. 28-19). O operon *ara* inclui estes três genes (chamados coletivamente de *ara*BAD), um sítio regulador com dois operadores (*ara*O_1 e *ara*O_2), um outro sítio de ligação para a proteína reguladora AraC chamado de *ara*I (I de indutora) e um promotor adjacente à *ara*I (P_{BAD}). O promotor *ara*O_2 possui um único sítio de ligação para a proteína AraC; *ara*I e *ara*O_1, cada

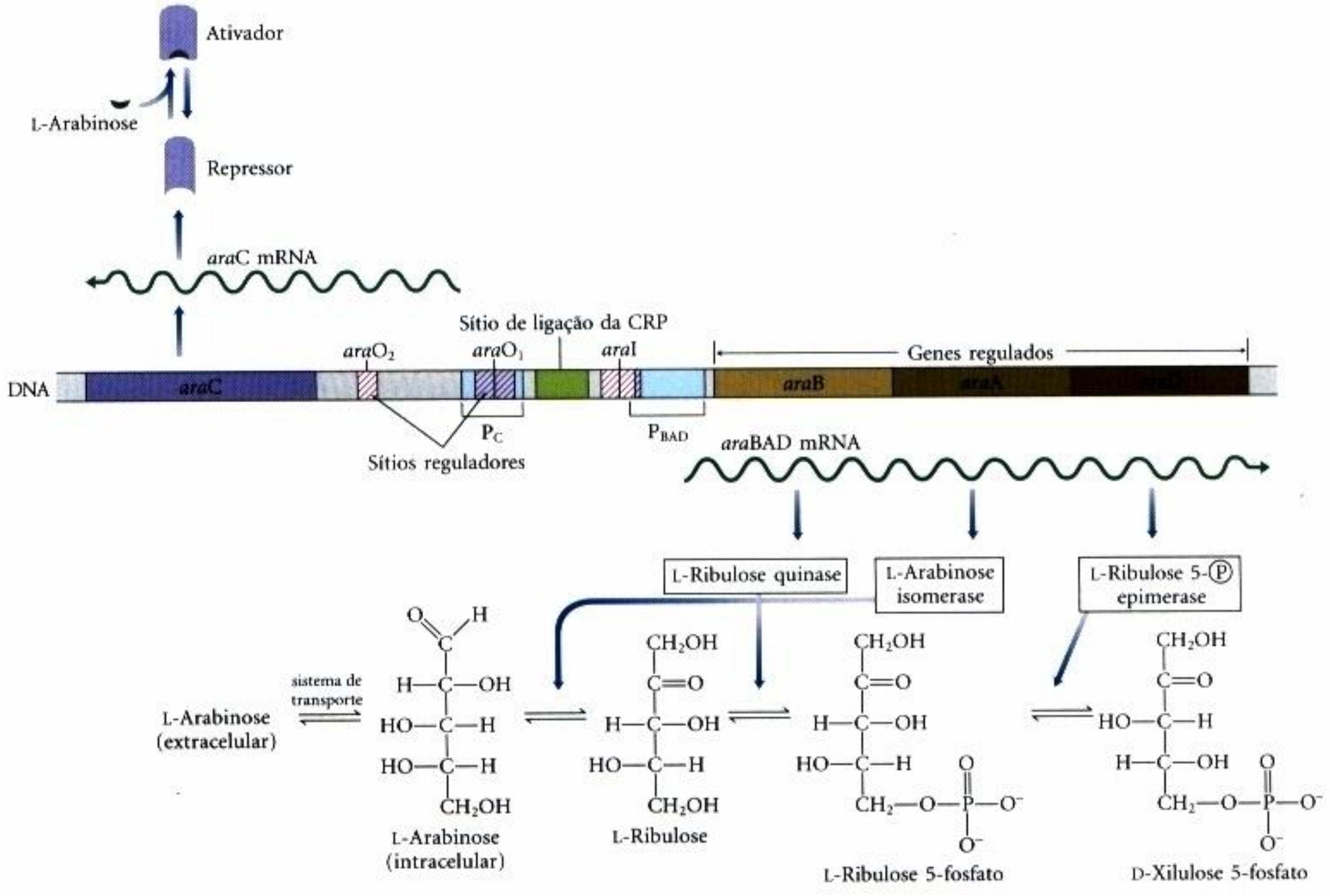

Ativador
L-Arabinose
Repressor
araC mRNA
Sítio de ligação da CRP
araO₂
araO₁
araI
Genes regulados
DNA
araC
araB
araA
araD
P_C
P_BAD
Sítios reguladores
araBAD mRNA
L-Ribulose quinase
L-Arabinose isomerase
L-Ribulose 5-Ⓟ epimerase
sistema de transporte
L-Arabinose (extracelular)
L-Arabinose (intracelular)
L-Ribulose
L-Ribulose 5-fosfato
D-Xilulose 5-fosfato

Figura 28-19 – O operon *ara*. Os genes e os sítios regulatórios estão descritos no texto. O metabolismo da arabinose, catalisado pelas enzimas codificadas pelos genes *ara*, está esquematizado na parte inferior da figura. O produto final desta via, a D-xilulose 5-fosfato, é um intermediário na via das pentoses fosfato (Capítulos 15 e 20).

um tendo dois sítios de ligação (chamados de meios-sítios) na mesma orientação. O gene *ara*C está próximo e é transcrito a partir do seu próprio promotor (P_C) na direção oposta aos genes *ara*B, A e D. O sítio de ligação da CRP está adjacente ao promotor do operon *ara* e a transcrição é modulada pelo CRP-cAMP, da mesma forma que no sistema *lac*. Neste ponto terminam as semelhanças com o sistema regulatório do *lac*.

O papel da proteína AraC na regulação do operon *ara* é complexo (Fig. 28-20). Primeiro, quando sua concentração excede cerca de 40 cópias por célula, ela regula sua própria síntese, ligando-se ao *ara*O_1 e reprimindo a transcrição do gene *ara*C. Segundo, ela age tanto como um regulador positivo como um negativo dos genes do *ara*BAD e, nessa qualidade, liga-se tanto ao *ara*O_2 quanto ao *ara*I.

A regulação pela AraC pode ser resumida considerando dois possíveis cenários metabólicos:

1. *A glicose está abundante e a arabinose não.* Nessas condições, a proteína dimérica AraC liga-se tanto ao *ara*O_2 quanto a meio *ara*I, formando uma alça de DNA de cerca de 210 pares de bases (Fig. 28-20b), reprimindo a transcrição dos genes *ara*BAD.
2. *A glicose está presente apenas em níveis baixos, mas a arabinose é disponível.* Nessas condições, a CRP-cAMP torna-se abundante e liga-se ao sítio adjacente à *ara*I. A arabinose também se liga à proteína AraC, alterando sua conformação. A alça de DNA formada pelo homodímero AraC se abre. A proteína AraC ligada ao *ara*I agora liga-se a ambos os meios-sítios da *ara*I e torna-se um ativador, agindo coordenadamente com a CRP-cAMP para induzir a transcrição dos genes *ara*BAD (Fig. 28-20c).

Quando tanto a arabinose quanto a glicose estão abundantes, ou ambas estão ausentes, o operon *ara* permanece reprimido, embora o "status" detalhado de várias proteínas reguladoras e dos seus sítios de ligação, nestas condições, não esteja claro. A regulação do operon *ara* é rápida e reversível, um exemplo de mudança de resposta no nível de regulação gênica à troca de condições ambientais.

Muitos genes para a biossíntese dos aminoácidos são regulados pela atenuação da transcrição

Os 20 aminoácidos-padrão são requeridos em grandes quantidades para a síntese de proteínas e a *E. coli* pode sintetizá-los a todos. Os genes das enzimas necessárias para sintetizar um certo aminoácido estão, geralmente, agrupadas num operon e são expressados toda vez que os suprimentos do aminoácido sejam inadequados para os requerimentos celulares. Quando o aminoácido estiver abundante, as enzimas biossintetizantes não são mais necessárias e o operon é reprimido.

O operon do triptofano (*trp*) da *E. coli* (Fig. 28-21) inclui cinco genes para as enzimas requeridas na conversão do corismato em triptofano. Observe que duas das enzimas catalisam

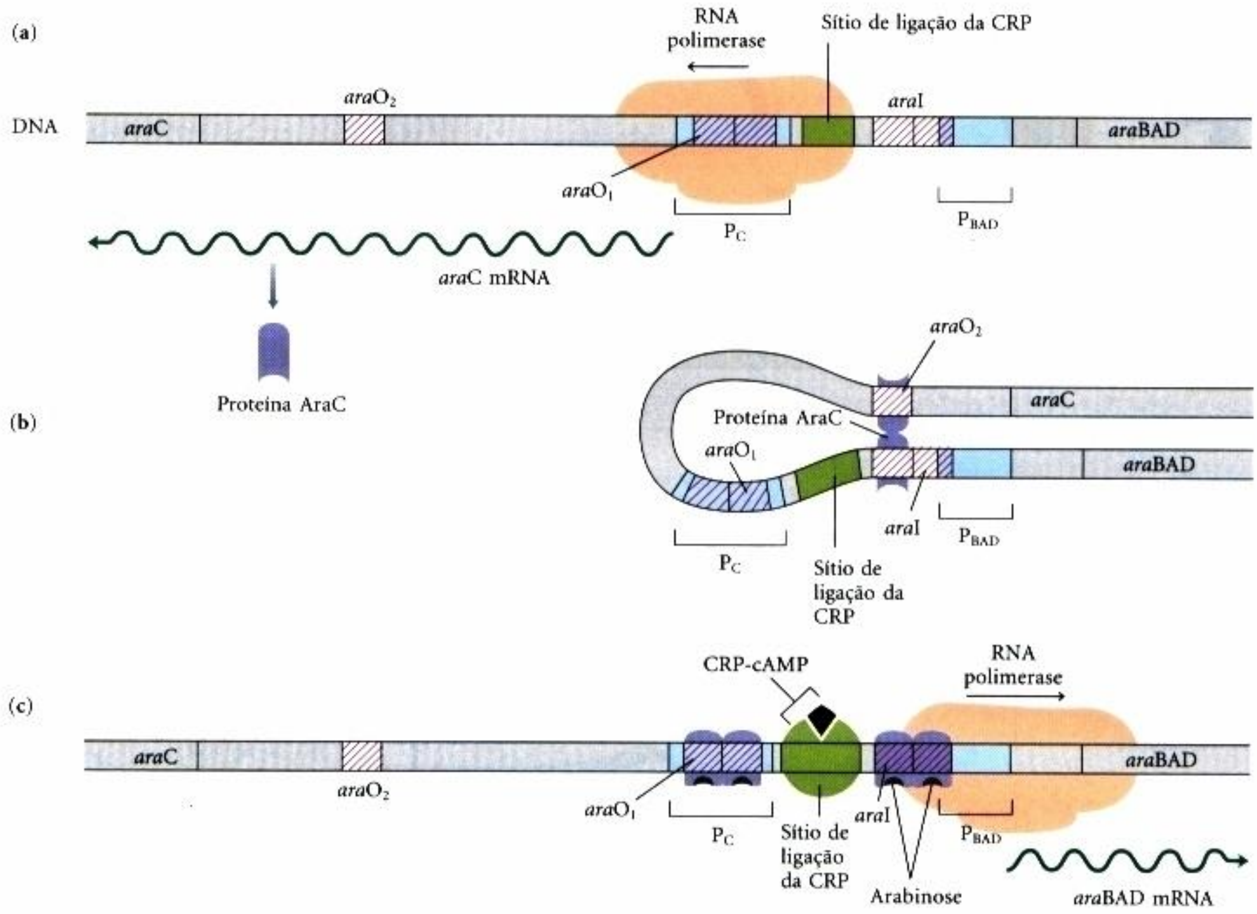


Figura 28-20 – Regulação do operon *ara*. (**a**) Quando a proteína AraC estiver depletada, o gene *araC* é transcrito a partir do seu promotor próprio. (**b**) Quando os níveis de glicose estiverem altos e os da arabinose baixos, a AraC liga-se tanto ao *araO*$_2$ quanto ao meio-sítio da *araI* e aproxima esses sítios, formando uma alça de DNA, reprimindo *araBAD*. (**c**) Quando a arabinose estiver presente e a concentração de glicose for baixa, a proteína AraC liga-se à arabinose e altera sua conformação para se tornar um ativador. A alça do DNA é aberta e a proteína AraC liga-se a cada metade dos sítios da *araI* e ao *araO*$_1$. As proteínas repetidas interagem entre si e atuam coordenadas com a CRP-cAMP para facilitar a transcrição dos genes *araBAD*.

mais de uma etapa na via. O mRNA do operon *trp* possui uma meia-vida de apenas cerca de 3min, permitindo à célula responder rapidamente às alterações necessárias para esse aminoácido. O repressor Trp é um homodímero, com cada subunidade contendo 107 resíduos de aminoácidos (Fig. 28-22). Quando o triptofano for abundante, ele se liga ao repressor Trp, provocando uma alteração conformacional que permite ao repressor se ligar ao operador *trp* e inibir a expressão do operon *trp*. O sítio do operador *trp* se sobrepõe ao promotor, de forma que a ligação ao repressor pode bloquear a ligação da RNA polimerase.

Novamente, esse circuito simples "ligar/desligar" mediado pelo repressor não é toda a história regulatória. Diferentes concentrações de triptofano podem variar a velocidade da síntese das enzimas biossintetizantes num intervalo de cerca de 700 vezes. Assim que a repressão for suspensa e a transcrição começar, a velocidade da transcrição é finamente controlada por um segundo processo regulatório chamado de **atenuação da transcrição**, em que a transcrição é normalmente iniciada, mas interrompida abruptamente *antes* que os genes do operon sejam transcritos. A freqüência com a qual a transcrição se atenua é regulada pelo triptofano disponível e depende de um acoplamento íntimo da transcrição e tradução na bactéria.

O mecanismo de atenuação do operon *trp* usa sinais codificados em quatro seqüências dentro de uma região **líder** de 162 nucleotídeos na extremidade 5′ do mRNA, que precede ao códon de iniciação para o primeiro gene (Fig. 28-23a). Dentro do líder, está uma região chamada de **atenuador**, constituída das seqüências 3 e 4. Essas seqüências se pareiam formando uma estrutura de haste e alça, rica em G≡C, seguida por uma série de resíduos de uridilato. Esta estrutura atenuadora age como um terminador da transcrição (Fig. 28-23b). A seqüência 2 é um complemento alternativo para a seqüência 3 (Fig. 28-23c). Se as seqüências 2 e 3 se parearem, a estrutura do atenuador não se formará e a transcrição continua para dentro do genes biossintetizantes do *trp*; a alça formada pelo pareamento das seqüências 2 e 3 não obstrui a transcrição.

A seqüência regulatória 1 é crucial para o mecanismo sensível ao triptofano que determina se a seqüência 3 pareia com a seqüência 2 (permitindo que a transcrição continue) ou com a seqüência 4 (transcrição atenuada). A formação da estrutura haste-e-alça do atenuador depende de eventos que ocorrem durante a *tradução* da seqüência regulatória 1, que codifica um peptídeo líder (assim chamado porque é codificado dentro da região líder do mRNA) de 14 aminoácidos, dois dos quais são resíduos de Trp. O peptídeo líder não possui nenhuma outra função conhecida; sua síntese é simplesmente um dispositivo regulatório do operon. Esse peptídeo é traduzido imediatamente depois de ser transcrito, por um ribossomo que segue atrás da RNA polimerase à medida que a transcrição prossegue.

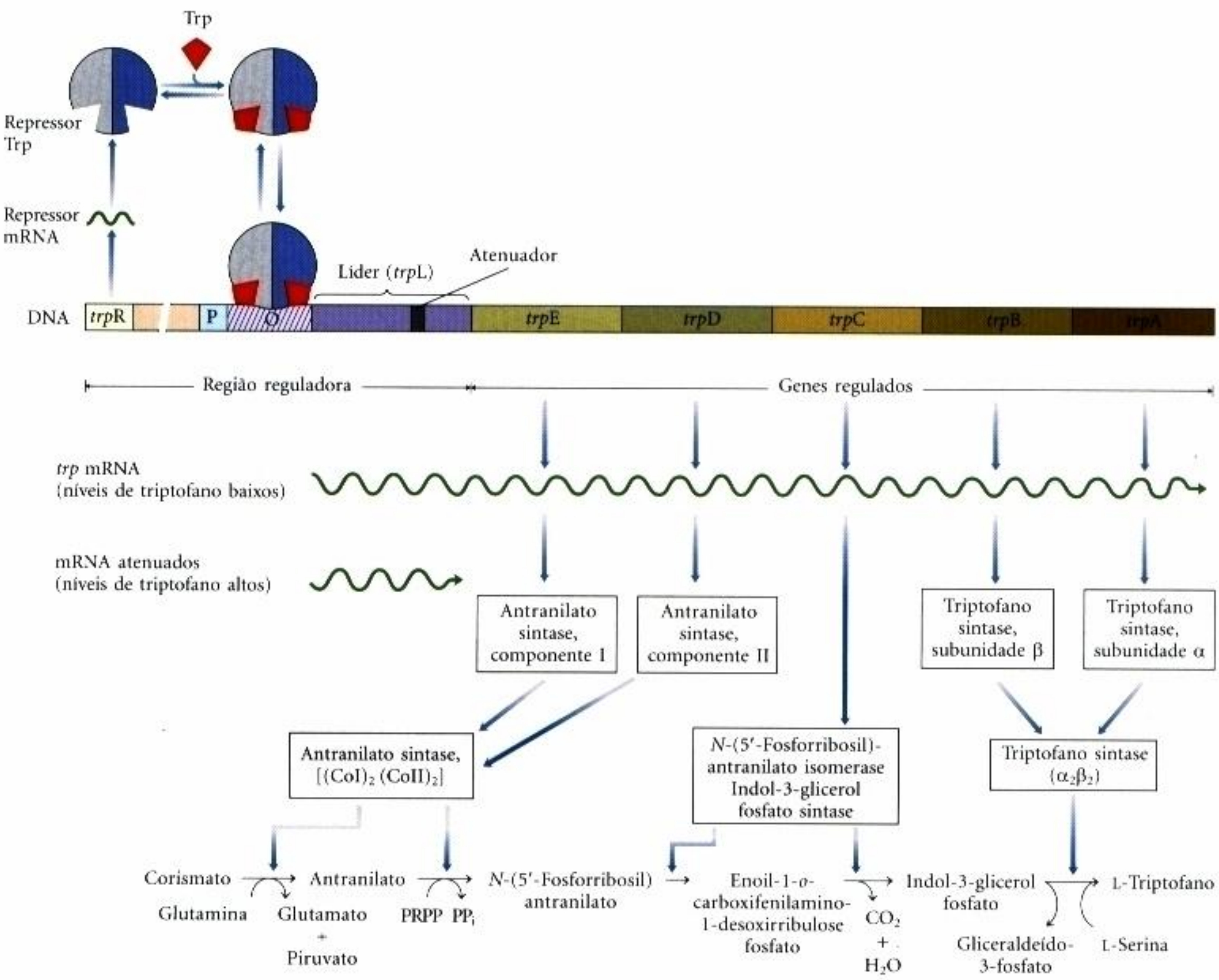

Trp
Repressor Trp
Repressor mRNA
Atenuador
Líder (*trp*L)
DNA
*trp*R
P
O
*trp*E
*trp*D
*trp*C
*trp*B
*trp*A
Região reguladora
Genes regulados
trp mRNA (níveis de triptofano baixos)
mRNA atenuados (níveis de triptofano altos)
Antranilato sintase, componente I
Antranilato sintase, componente II
Triptofano sintase, subunidade β
Triptofano sintase, subunidade α
Antranilato sintase, [(CoI)₂ (CoII)₂]
N-(5'-Fosforribosil)-antranilato isomerase Indol-3-glicerol fosfato sintase
Triptofano sintase (α₂β₂)
Corismato
Glutamina
Antranilato
Glutamato + Piruvato
PRPP
PPᵢ
N-(5'-Fosforribosil) antranilato
Enoil-1-o-carboxifenilamino-1-desoxirribulose fosfato
CO₂ + H₂O
Indol-3-glicerol fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato
L-Serina
L-Triptofano

Figura 28-21 – O operon *trp*. Este operon é regulado por dois mecanismos: quando os níveis de triptofano estiverem altos, (1) o repressor (esquerda superior) liga-se ao operador e (2) a transcrição do mRNA do *trp* é atenuada (veja Fig. 28-23). A biossíntese do triptofano pelas enzimas codificadas no operon *trp* está esquematizada na parte inferior da figura.

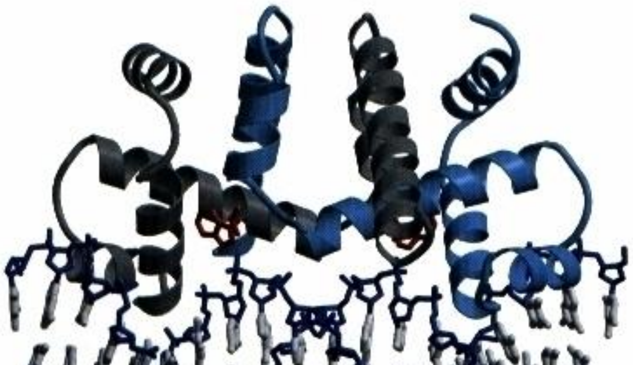
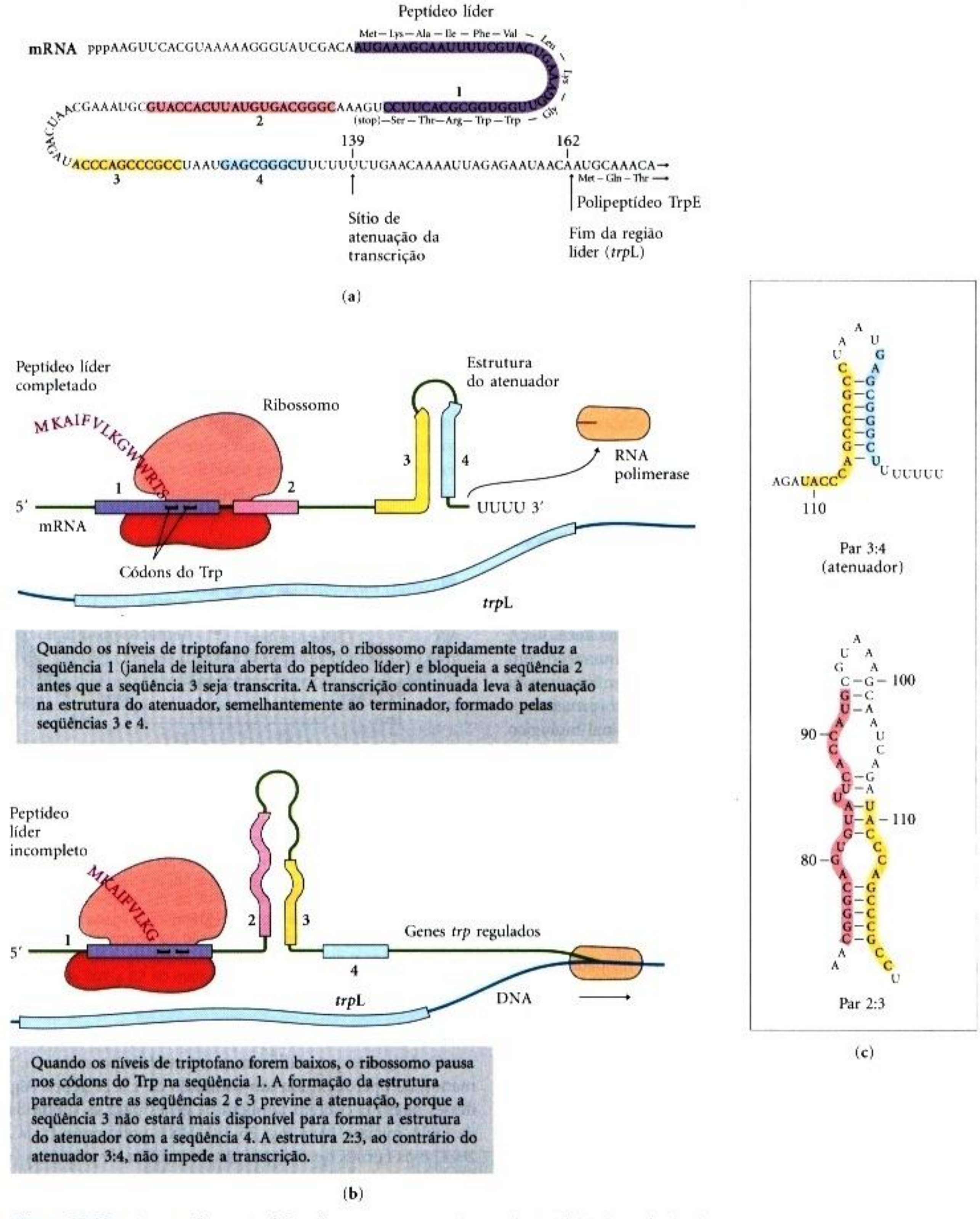


Figura 28-22 – O repressor do Trp. O repressor é um dímero, com duas subunidades (cinza e azul-claro) ligando o DNA a um motivo hélice-volta-hélice. As moléculas do triptofano ligadas estão em vermelho.

Quando as concentrações do triptofano forem altas, as concentrações do tRNA carregado com o triptofano (Trp-tRNA$^{\text{Trp}}$) também serão altas. Isso permite que a tradução prossiga rapidamente depois dos dois códons do triptofano da seqüência 1 para o interior da seqüência 2 antes que a seqüência 3 seja sintetizada pela RNA polimerase. Nesse caso, a seqüência 2 é coberta pelo ribossomo e, portanto, torna-se não disponível para o pareamento com a seqüência 3, quando ela for sintetizada; a estrutura do atenuador (seqüências 3 e 4) é formada e a transcrição pára (Fig. 28-23b, imagem superior). Quando as concentrações do triptofano forem baixas, entretanto, o ribossomo pára nos dois códons do triptofano na seqüência 1, porque o tRNA$^{\text{Trp}}$ é menos disponível. A seqüência 2 permanece livre à medida que a seqüência 3 for sintetizada, permitindo que essas duas seqüências possam formar pares de bases e deixando a transcrição prosseguir (Fig. 28-23b, imagem inferior). Dessa forma, a proporção dos transcritos que são atenuados aumenta à medida que as concentraçõe s do triptofano aumentarem.


Peptídeo líder
Met – Lys – Ala – Ile – Phe – Val – Leu – Lys – Gly
mRNA pppAAGUUCACGUAAAAAGGGUAUCGACAAUGAAAGCAAUUUUCGUACUGAAAGGUUGGUGGCGCACUUCCUGAAACGGGCAGUGUAUUCACCAUGCGUAAAGCAAUCAGAUACCCAGCCCGCCUAAUGAGCGGGCUUUUUUUUGAACAAAAUUAGAGAAUAACAAUGCAAACA→
1
2
3
4
(stop)—Ser — Thr—Arg— Trp — Trp
139
162
Met – Gln – Thr →
Polipeptídeo TrpE
Sítio de atenuação da transcrição
Fim da região líder (trpL)
(a)
Peptídeo líder completado
MKAIFVLKGWWRTS
Ribossomo
Estrutura do atenuador
RNA polimerase
5′
mRNA
UUUU 3′
Códons do Trp
trpL
Peptídeo líder incompleto
MKAIFVLKG
Genes trp regulados
DNA
(b)
AGAUACC
UUUUU
110
Par 3:4 (atenuador)
100
90
110
80
Par 2:3
(c)

Quando os níveis de triptofano forem altos, o ribossomo rapidamente traduz a seqüência 1 (janela de leitura aberta do peptídeo líder) e bloqueia a seqüência 2 antes que a seqüência 3 seja transcrita. A transcrição continuada leva à atenuação na estrutura do atenuador, semelhantemente ao terminador, formado pelas seqüências 3 e 4.

Quando os níveis de triptofano forem baixos, o ribossomo pausa nos códons do Trp na seqüência 1. A formação da estrutura pareada entre as seqüências 2 e 3 previne a atenuação, porque a seqüência 3 não estará mais disponível para formar a estrutura do atenuador com a seqüência 4. A estrutura 2:3, ao contrário do atenuador 3:4, não impede a transcrição.

Figura 28-23 – Atenuação transcricional no operon *trp*. A transcrição é iniciada no início dos 162 nucleotídeos do mRNA líder codificado por uma região chamada de *trp*L (veja Fig. 28-21). Um mecanismo regulatório determina quando a transcrição é atenuada no final do líder ou continua dentro dos genes estruturais. (**a**) O mRNA líder do *trp* (*trp*L). O mecanismo de atenuação no operon *trp* envolve seqüências de 1 a 4 (realçadas). (**b**) A seqüência 1 codifica um peptídeo pequeno, peptídeo líder, contendo dois resíduos de Trp (W); ele é traduzido imediatamente depois da transcrição começar. As seqüências 2 e 3 são complementares, da mesma forma que as seqüências 3 e 4 (topo). Sua estrutura e função são semelhantes àquelas de um terminador da transcrição (veja Fig. 26-7). O pareamento das seqüências 2 e 3 (parte inferior da figura) previne a formação da estrutura do atenuador. Observe que o peptídeo líder não tem nenhuma outra função celular. A tradução dessa janela aberta de leitura possui uma função puramente regulatória que determina que seqüências complementares (2 e 3 ou 3 e 4) sejam pareadas. (**c**) Esquemas de pareamento de bases para as regiões complementares do mRNA líder do *trp*.

Muitos outros operons biossintetizantes de aminoácidos usam uma estratégia de atenuação semelhante para controlar finamente as enzimas biossintetizantes para satisfazer os requerimentos celulares prevalecentes. O peptídeo líder de 15 aminoácidos, produzido pelo operon da *phe*, contém sete resíduos de Phe. O peptídeo líder do operon *leu* possui quatro resíduos contíguos de Leu. O peptídeo líder para o operon da *his* contém sete resíduos contíguos de His. Na verdade, no operon *his* e vários outros (exceto o *trp*), a atenuação é suficientemente sensível para ser o único mecanismo regulador.

A indução da resposta SOS requer a destruição de proteínas repressoras

A lesão abrangente do DNA no cromossomo bacteriano desencadeia a indução de muitos genes localizados dispersamente. Essa resposta, chamada de resposta SOS (pág. 754), fornece um outro bom exemplo da regulação coordenada de muitos genes. Muitos genes induzidos estão envolvidos no reparo do DNA e na mutagênese (veja Tabela 25-6). Os elementos reguladores chave são a proteína RecA e o repressor LexA.

O repressor LexA (M_r 22.700) inibe a transcrição de todos os genes SOS (Fig. 28-24), e a indução da resposta SOS requer a remoção do LexA. Isso não é apenas a sua dissociação do DNA, em resposta à ligação de uma molécula pequena, como na regulação dos operons *lac*, *ara* e *trp* descritos anteriormente. Em vez disso, o repressor LexA é inativado quando catalisa sua própria clivagem numa ligação peptídica específica Ala–Gly, produzindo dois fragmentos protéicos aproximadamente iguais. Em pH fisiológicos, esta reação de autoclivagem requer a proteína RecA. RecA não é uma protease no sentido clássico, mas sua interação com LexA facilita a reação de autoclivagem do repressor. Essa função da RecA é, algumas vezes, chamada de atividade co-protease.

A proteína RecA fornece a ligação entre o sinal biológico (lesão do DNA) e a indução dos genes SOS. Lesões extensas do DNA levam a numerosos vazios na fita simples do DNA, e a RecA facilita a clivagem do repressor LexA apenas quando a RecA estiver ligada a uma fita simples de DNA (Fig. 28-24, imagem inferior). Ligando-se aos vazios, finalmente ativa a RecA, levando à clivagem do repressor LexA e à indução SOS.

Durante a indução da resposta SOS numa célula gravemente lesada, RecA também cliva e, portanto, inativa os repressores que, de outra forma, permitiriam certos vírus a propagarem-se num estado dormente lisogênico dentro da bactéria hospedeira. Isso fornece uma excelente ilustração da adaptação evolucionária. Esses repressores, como o LexA, também sofrem autoclivagem em ligações peptídicas específicas Ala–Gly, de forma que a resposta SOS permite a replicação do vírus e a lise da célula, liberando novas partículas virais. Dessa forma, o bacteriófago pode fazer uma saída violenta de uma célula bacteriana comprometida.

A síntese das proteínas ribossômicas é coordenada com a síntese do rRNA

Nas bactérias, uma demanda celular aumentada para a síntese de proteínas é alcançada pelo aumento do número de ribossomos em vez de pela alteração na atividade dos ribossomos individuais. Em geral, o número de ribossomos aumenta à medida que a velocidade do crescimento celular aumenta. Em altas taxas de crescimento, os ribossomos constituem aproximadamente 45% do peso seco da célula. A proporção dos recursos celulares devotados a fazer os ribossomos é tão grande e as funções dos ribossomos tão importantes, que as células precisam coordenar a síntese das proteínas ribossômicas (r-proteínas) e dos rRNAs. Essa regulação é distinta dos mecanismos descritos até então, porque ela ocorre principalmente no nível da *tradução*.

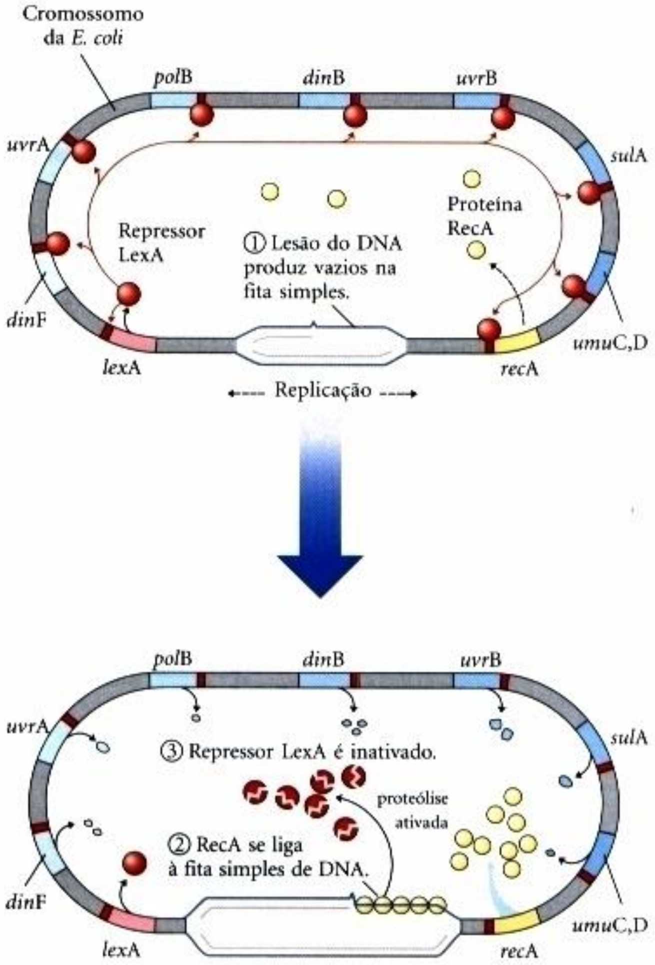


Figura 28-24 – A resposta SOS na *E. coli*. Veja a Tabela 25-6 para as funções destes genes. A proteína LexA é o repressor neste sistema, com um sítio operador (vermelho) próximo de cada gene. A célula normal, pelo fato de o gene RecA não ser inteiramente reprimido pelo repressor LexA, contém cerca de 1.000 monômeros de RecA. ① Quando o DNA for extensamente lesado (por exemplo, pela luz UV), a replicação do DNA é interrompida e o número de vazios, na fita simples do DNA, aumenta. ② A proteína RecA liga-se a este DNA de fita simples, estimulando a atividade de co-protease da proteína. ③ Enquanto ligada ao DNA, a proteína RecA facilita a clivagem e a inativação do repressor LexA. Quando o repressor estiver inativado, os genes SOS, incluindo o da *recA*, são induzidos; os níveis da proteína RecA aumentam de 50 a 100 vezes.

Os 52 genes que codificam as r-proteínas ocorrem em, pelo menos, 20 operons, cada um contendo de 1 a 11 genes. Alguns desses operons contêm também os genes para as subunidades da DNA iniciase (veja Fig. 25-14), RNA polimerase (veja Fig. 26-4) e os fatores de alongamento da síntese de proteínas (veja Fig. 27-26) — explicando o acoplamento íntimo da replicação, transcrição e síntese de proteínas durante o crescimento celular.

Os operons das r-proteínas são regulados principalmente por um mecanismo de retroalimentação traducional. Uma r-proteína codificada em cada operon também funciona como um **repressor da tradução**, que se liga ao transcrito do mRNA daquele operon e bloqueia a tradução de todos os genes que o mensageiro codifica (Fig. 28-25). Em geral, a r-proteína que desempenha o papel de repressor também se liga diretamente a um rRNA. Cada uma das r-proteínas repressoras da tradução liga-se ao rRNA apropriado com maior afinidade do que para com o seu mRNA, de forma tal que o mRNA será ligado e a tradução reprimida apenas se o nível da r-proteína exceder aquele do rRNA.

Isso garante que a tradução dos mRNAs, codificando as r-proteínas, seja reprimido apenas quando a síntese dessas r-proteínas exceder aquela necessária para fazer os ribossomos funcionais. Dessa maneira, a velocidade da síntese das r-proteínas é mantida em balanço com a disponibilidade de rRNA.

O sítio de ligação do mRNA para o repressor da tradução está perto do sítio de começo da tradução de um dos genes no operon, usualmente o primeiro gene (Fig. 28-25). Em outros operons, isso afetaria apenas aquele gene, porque, nos mRNAs policistrônicos bacterianos, a maioria dos genes tem sinais de tradução independentes. Nos operons das r-proteínas, entretanto, a tradução de cada gene depende da tradução de todos os outros. O mecanismo desse acoplamento traducional ainda não está entendido em detalhes. Entretanto, em alguns casos, a tradução de genes múltiplos parece estar bloqueada pelo enovelamento do mRNA numa estrutura tridimensional elaborada que é estabilizada tanto pelo pareamento de bases (como na Fig. 10-25) quanto pela ligação da proteína repressora da tradução. Quando o repressor traducional estiver ausente, a ligação do ribossomo e a tradução de um ou mais dos genes rompe o enovelamento da estrutura do mRNA e permite que todos os genes sejam traduzidos.

Os operons das r-proteínas são também aparentemente regulados no nível da iniciação da transcrição, porque a transcrição aumenta com o aumento das taxas de crescimento celular. Ainda não entendemos o mecanismo da regulação transcricional ou as relações detalhadas entre a regulação transcricional e a traducional nesse sistema.

Pelo fato de a síntese das r-proteínas ser coordenada com a dos rRNAs disponíveis, a regulação da produção dos ribossomos reflete a regulação da síntese do rRNA. Na *E. coli*, a síntese do rRNA, a partir dos sete operons do rRNA, responde à taxa do crescimento celular e às alterações na disponibilidade dos nutrientes cruciais, particularmente os aminoácidos.

A regulação coordenada com as concentrações dos aminoácidos é chamada de **resposta estringente** (Fig. 28-26). Quando as concentrações dos aminoácidos são baixas, a síntese do rRNA é interrompida. A carência dos aminoácidos leva à ligação dos tRNAs não carregados ao sítio A nos ribossomos. Isso desencadeia uma seqüência de eventos que começa com a ligação de uma enzima chamada de **fator de estringência** (proteína RelA) ao ribossomo. Quando ligado ao ribossomo, o fator de estringência catalisa a formação do nucleotídeo não usual à guanosina tetrafosfato (ppGpp; veja Fig. 10-42), adicionando pirofosfato à posição 3' do GTP na reação:

$$\text{GTP} + \text{ATP} \longrightarrow \text{ppGpp} + \text{AMP}$$

A elevação abrupta do ppGpp, em resposta à carência dos aminoácidos, leva a uma grande redução na síntese do rRNA, mediada pelo menos em parte pela ligação do ppGpp à RNA polimerase.

O nucleotídeo ppGpp, ao lado do cAMP, pertence a uma classe de nucleotídeos modificados que atua como mensageiros celulares secundários (pág. 275). Na *E. coli*, esses dois nucleotídeos funcionam como sinais de carência; eles provocam grandes alterações no metabolismo celular, aumentando ou diminuindo a transcrição de centenas de genes. Nas células eucarióticas, nucleotídeos mensageiros secundários semelhantes possuem funções regulatórias múltiplas. A coordenação do metabolismo celular com o crescimento celular é muito complexa, e outros mecanismos reguladores ainda estão para ser descobertos.

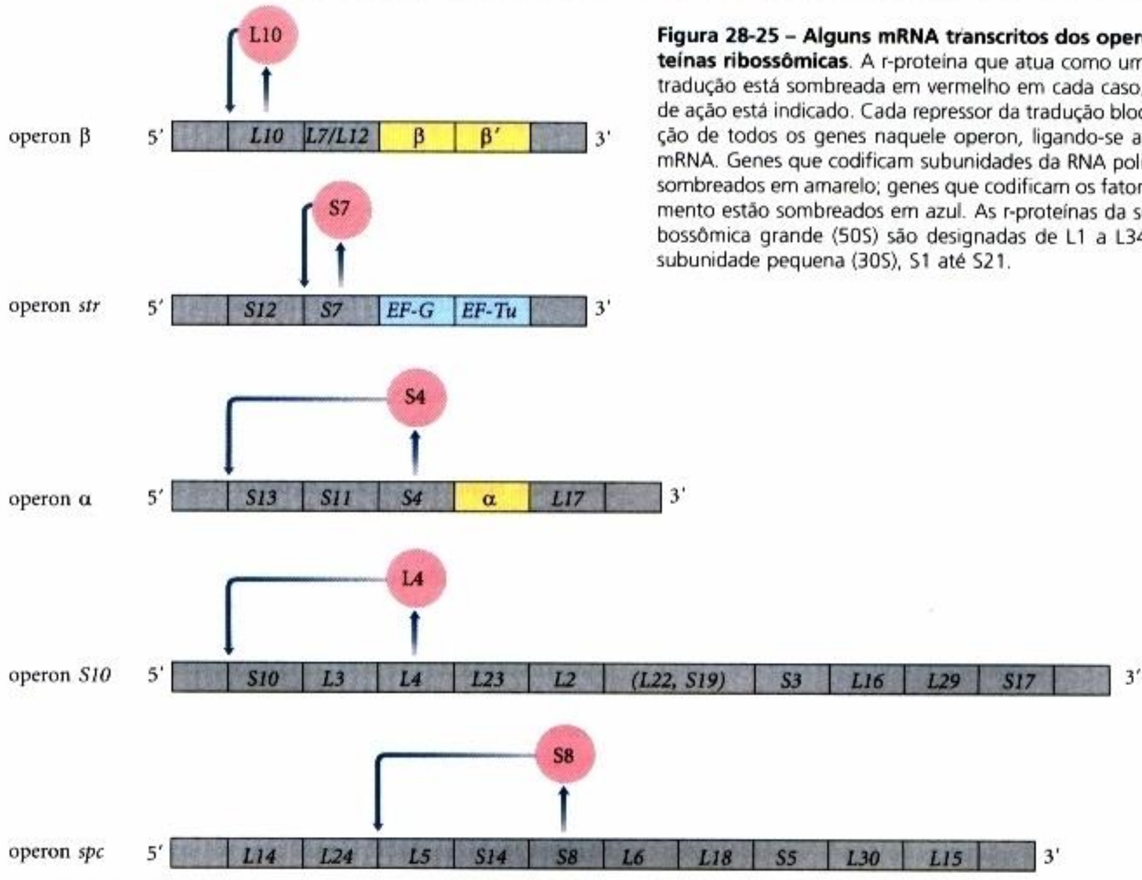


Figura 28-25 – Alguns mRNA transcritos dos operons das proteínas ribossômicas. A r-proteína que atua como um repressor de tradução está sombreada em vermelho em cada caso, e o seu sítio de ação está indicado. Cada repressor da tradução bloqueia a tradução de todos os genes naquele operon, ligando-se a este sítio no mRNA. Genes que codificam subunidades da RNA polimerase estão sombreados em amarelo; genes que codificam os fatores de alongamento estão sombreados em azul. As r-proteínas da subunidade ribossômica grande (50S) são designadas de L1 a L34; aquelas da subunidade pequena (30S), S1 até S21.

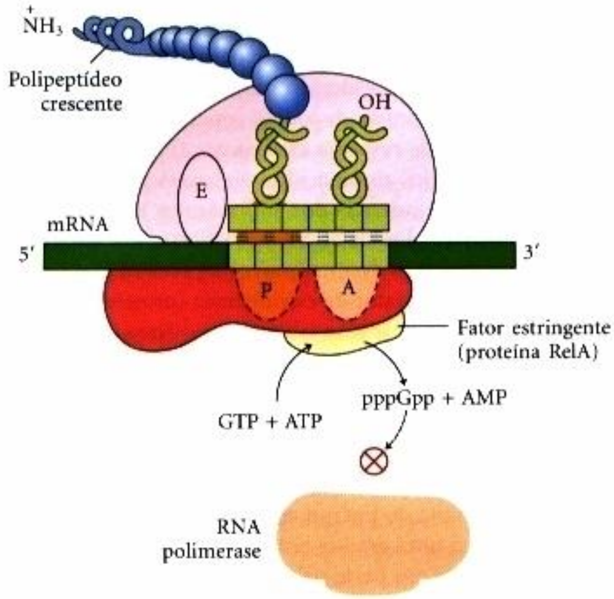


Figura 28-26 – A resposta estringente na *E. coli*. Esta resposta à carência de aminoácidos é desencadeada pela ligação de um tRNA descarregado no sítio ribossômico A. Uma proteína chamada de fator de estringência liga-se ao ribossomo e catalisa a síntese do pppGpp. Uma fosfoidrolase cliva então um fosfato formando o ppGpp. O sinal ppGpp reduz a transcrição de alguns genes e aumenta a de outros, em parte, pela ligação à subunidade β da RNA polimerase, alterando a especificidade da enzima ao promotor. A síntese do rRNA é diminuída quando os níveis de ppGpp aumentam.

Alguns genes são regulados por recombinação genética

A bactéria *Salmonella* vive no intestino dos mamíferos e se move rodando os flagelos na sua superfície celular (Fig. 28-27). As muitas cópias da proteína flagelina (M_r 53.000), que constituem os flagelos, são alvos proeminentes do sistema imune dos mamíferos. Num mecanismo de escape da resposta imune, as células da *Salmonella* oscilam entre duas proteínas flagelinas distintas (FljB e FliC) mais ou menos uma vez em cada 1.000 gerações celulares, usando um processo chamado de **variação de fase.**

Figura 28-27 – A *Salmonella typhimurium*, com flagelos evidentes.

A mudança é acompanhada pela inversão periódica de um segmento de DNA que contém o promotor para um gene da flagelina. A inversão é uma reação de recombinação sítio-específica (pág. 760), mediada pela recombinase chamada de Hin em seqüências específicas de 14 pares de bases (seqüências *hix*) em ambas as extremidades do segmento de DNA. Quando o segmento de DNA estiver numa orientação, o gene para a flagelina FljB e o gene que codifica um repressor (FljA) são expressos (Fig. 28-28a). O repressor interrompe a expressão do gene para a flagelina FliC. Quando o segmento do DNA estiver invertido (Fig. 28-28b), os genes *flj*A e *flj*B não são mais transcritos e o gene *fli*C é induzido quando o repressor se depletar. A recombinase Hin codificada pelo gene *hin* no segmento de DNA que sofre a inversão é expressa quando o segmento estiver em qualquer uma das orientações, de forma que é sempre possível mudar de um estado para o outro.

Este mecanismo regulador possui a vantagem de ser absoluto: a expressão gênica é impossível quando o gene estiver fisicamente separado do seu promotor (veja a posição do promotor *flj*B na Fig. 28-28b). Uma mudança absoluta liga/desliga pode ser importante neste sistema (mesmo embora ela afete apenas um dos dois genes flagelinas), porque um flagelo, mesmo com uma cópia da proteína flagelar errada, será vulnerável à ação dos anticorpos direcionados contra aquela proteína. O sistema *Salmonella* de modo algum é único. Sistemas reguladores semelhantes ocorrem em várias bactérias e bacteriófagos e sistemas de recombinação com funções semelhantes foram encontrados em eucariotos (Tabela 28-1). A regulação gênica por rearranjos do DNA que movem genes e/ou promotores é particularmente comum em patógenos que se beneficiam para trocar de hospedeiro ou para mudar suas proteínas da superfície, enganando, portanto, o sistema imune do hospedeiro.

Regulação da Expressão Gênica nos Eucariotos

A iniciação da transcrição é um ponto de regulação principal para a expressão gênica tanto de procariotos quanto de eucariotos. Embora alguns dos mesmos mecanismos regulatórios sejam usados em ambos os sistemas, há uma diferença fundamental no mecanismo da transcrição nos eucariotos e nas bactérias. A atividade inerente dos promotores e a maquinaria transcripcional *in vivo* na ausência de seqüências regulatórias podem ser definidas como o estado basal transcricional. Nas bactérias, a RNA polimerase geralmente tem acesso a cada promotor e pode ligar-se e iniciar a transcrição com algum grau de eficiência, na ausência de ativadores e de repressores. O estado basal transcricional é, portanto, não restritivo. Ao contrário, promotores eucarióticos fortes são geralmente inativos *in vivo* na ausência de seqüências regulatórias, ou seja, o estado basal transcricional é restritivo. Essa diferença fundamental dá origem a pelo menos quatro características importantes que distinguem a regulação da expressão em eucariotos daquela nas bactérias.

Primeiro, o acesso aos promotores eucarióticos é restrito pela estrutura da cromatina, e a ativação da transcrição é associada com alterações múltiplas na estrutura da cromatina na região transcrita. Segundo, embora os elementos regulatórios positivos e negativos sejam encontrados nas células eucarióticas, os mecanismos positivos predominam em todos os sistemas caracterizados até agora. Dado que o estado basal transcricional é restritivo, virtualmente todo gene eucariótico requer ativação para ser transcrito. Terceiro, as células eucarióticas possuem proteínas reguladoras multiméricas maiores e mais complexas do que as bactérias. Finalmente, a transcrição no núcleo eucariótico está separada tanto no espaço quanto no tempo da tradução no citoplasma.

As discussões que se seguem demonstram como a complexidade dos circuitos regulatórios nas células eucarióticas é extraordinária. Concluímos com uma descrição detalhada da elaborada cascata regulatória que controla o desenvolvimento da mosca das frutas.

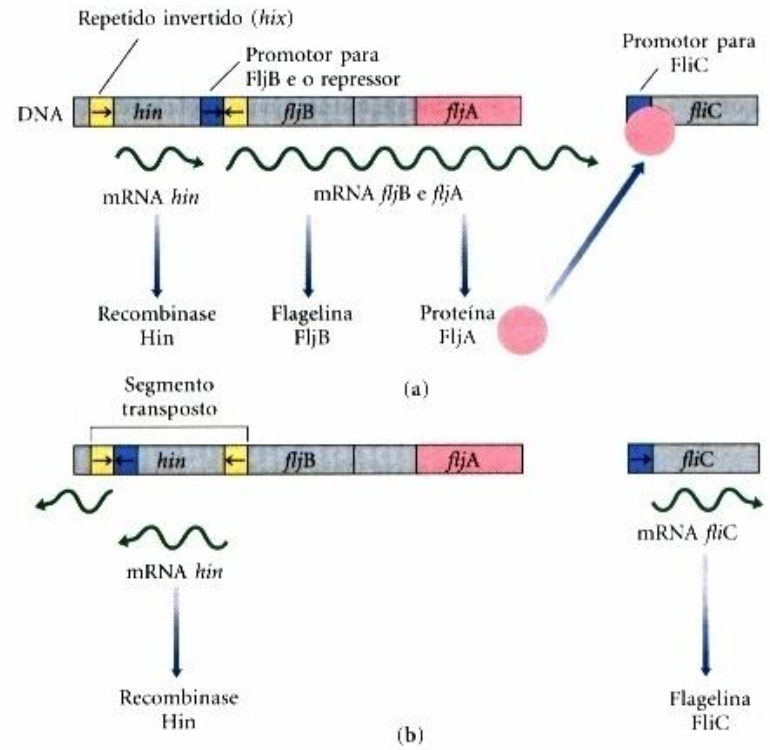


Figura 28-28 – Regulação dos genes da flagelina na *Salmonella*: variação de fase. Os produtos dos genes *fliC* e *fljB* são flagelinas diferentes. O gene *hin* codifica a recombinase que catalisa a inversão do segmento de DNA que inclui o promotor *fljB* e o gene *hin*. Os sítios de recombinação (repetições invertidas) são chamados de *hix* (amarelo). (**a**) Em uma orientação, *fljB* é expresso junto a uma proteína repressora (produto do gene *fljA*) que reprime a transcrição do gene *fliC*. (**b**) Na orientação oposta, apenas o gene *fliC* é expresso; os genes *fljA* e *fljB* não conseguem ser transcritos. A interconversão entre estes dois estados, chamada de variação de fase, requer também duas outras proteínas de ligação não específica ao DNA, HU (uma proteína semelhante à histona encontrada em U13, uma cepa da *E. coli*, do inglês "*h*istone*l*ike protein from *U13*") e FIS (fator de estimulação da inversão, do inglês "*f*actor for *i*nversion *s*timulation").

Tabela 28-1 – Exemplos de regulação gênica por recombinação

Sistema	Recombinase/ sítio de recombinação	Tipo de recombinação	Função
Variação de fase (*Salmonella*)	Hin/*hix*	Sítio específico	Expressão alternativa de dois genes de flagelina; permite enganar o sistema imune do hospedeiro
Variação de hospedeiro (bacteriófago μ)	Gin/*gix*	Sítio específico	Expressão alternativa de dois conjuntos de genes da cauda; afeta a variação de hospedeiro
Mudança do tipo de gameta (levedura)	Endonuclease HO, proteína RAD52, outras proteínas/*MAT*	Conversão não recíproca de genes[*]	Expressão alternativa dos dois tipos de gameta da levedura, a e α criam células dos diferentes tipos de gameta que podem se conjugar e realizar meiose
Variação antigênica (tripanossomos)[†]	Várias	Conversão não recíproca de genes[*]	Expressão sucessiva de genes diferentes que codificam as glicoproteínas variáveis da superfície (VSGs) permite a evasão da resposta imune do hospedeiro

[*] Conversão não recíproca de genes é uma classe de eventos de recombinação não discutidos no Capítulo 25. A informação genética se movimenta de uma parte do genoma (onde está silenciosa) para outra (onde é expressa) numa reação semelhante à transposição replicativa (veja Fig. 25-41).

[†] O tripanossomo causa a doença do sono africana e outras doenças (veja Adendo 22-2). A superfície externa de um tripanossomo é feito de múltiplas cópias de uma única VSG, o principal antígeno de superfície. Uma célula pode trocar seus antígenos de superfície em mais de 100 formas diferentes, evitando uma defesa efetiva do sistema imune do hospedeiro. As infecções pelo tripanossomo são crônicas e, se não tratadas, levam à morte.

A cromatina transcricionalmente ativa é estruturalmente distinta da cromatina inativa

Os efeitos da estrutura do cromossomo na regulação gênica nos eucariotos não têm paralelo claro nos procariotos. A transcrição de um gene eucariótico é fortemente reprimida quando o DNA está condensado dentro da cromatina. Regiões cromossômicas transcricionalmente ativas possuem uma sensibilidade aumentada à degradação mediada por nucleases. Nucleases, como a DNase I, tendem a clivar o DNA de cromatina cuidadosamente isolada em fragmentos com múltiplos de 200 pares de bases, refletindo a estrutura repetitiva regular do nucleossomo (veja Fig. 24-24). Nas regiões transcritas ativamente, os fragmentos produzidos pela atividade nucleásica são menores e mais heterogêneos em tamanho. Essas regiões contêm seqüências que são especialmente sensíveis à DNase I, chamadas de **sítios de hipersensibilidade**, consistindo em cerca de 100 a 200 pares de bases dentro dos 1.000 pares de bases que flanqueiam as extremidades 5′ dos genes transcritos. Em alguns genes, os sítios de hipersensibilidade são encontrados distantes da extremidade 5′, próximo à extremidade 3′ ou mesmo dentro do próprio gene.

Modificações aumentam a acessibilidade ao DNA

Muitos sítios hipersensíveis correspondem aos sítios de ligação para proteínas reguladoras conhecidas, e a relativa ausência de nucleossomos, nessas regiões, pode facilitar a ligação das proteínas. Os nucleossomos estão inteiramente ausentes em algumas regiões, que são muito ativas na transcrição, como nos genes rRNAs. A cromatina transcricionalmente ativa tende a ser deficiente em histona H1, e as outras histonas básicas são provavelmente modificadas por acetilação (veja a seguir) ou pela ligação da ubiquitina (veja Fig. 27-44).

A metilação 5′ de resíduos de citosina, de seqüências CpG, é comum no DNA eucariótico (pág. 271), entretanto, o DNA na cromatina transcricionalmente ativa tende a ser submetilado. Além disso, sítios de CpG em genes particulares são mais freqüentemente submetilados nas células dos tecidos onde os genes são expressos do que naquelas onde eles não são expressos. O padrão global sugere que a cromatina ativa seja preparada para a transcrição pela remoção de barreiras estruturais potenciais.

A cromatina é remodelada pela acetilação e por deslocamentos nucleossomais

Os mecanismos detalhados para as alterações estruturais na cromatina associadas à transcrição, chamadas de **remodelamento da cromatina**, estão vindo à luz, incluindo a identificação de enzimas que acetilam e deacetilam as histonas básicas do nucleossomo e outras que usam a energia química do ATP para remodelar os nucleossomos no DNA (Tabela 28-2).

Cada uma das histonas básicas (H2A, H2B, H3, H4; veja Fig. 24-24) possui dois domínios estruturais distintos. Um domínio central está envolvido nas interações histona-histona e no enrolamento do DNA em volta do nucleossomo. Um segundo domínio aminoterminal, rico em lisina, está geralmente posicionado próximo ao exterior da partícula nucleossômica montada; os resíduos de lisina são acetilados pelas *h*istona *a*cetil*trans*ferases (HATs). As HATs citosólicas (tipo B) acetilam as histonas recém-sintetizadas antes de elas serem importadas para o núcleo. A montagem subseqüente das histonas dentro da cromatina é facilitada por proteínas adicionais: CAF1 para a H3 e H4, e a NAP1 para a H2A e H2B.

Quando a cromatina estiver sendo ativada para a transcrição, as histonas nucleossômicas são acetiladas pelas HATs nucleares (tipo A). A acetilação de resíduos múltiplos de Lys nos domínios aminoterminais das histonas H3 e H4 podem reduzir a afinidade do nucleossomo inteiro para o DNA. A acetilação pode também prevenir ou promover interações com outras proteínas envolvidas na transcrição ou na sua regulação. Quando a transcrição de um gene não for mais requerida, a acetilação dos nucleossomos naquela vizinhança é reduzida pela histona deacetilase, como parte de um processo geral de silenciamento do gene que restaura a cromatina a um estado transcricionalmente inativo.

O remodelamento da cromatina requer também proteínas complexas que ativamente movem ou deslocam os nucleossomos, hidrolisando ATP no processo. O complexo enzimático SWI/SNF (Tabela 28-2), encontrado em todas as células eucarióticas, contém, pelo menos, 11 polipeptídeos (total M_r 2×10^6) que juntos criam sítios de hipersensibilidade na cromatina e estimulam a ligação de fatores de transcrição. SWI/SNF não é requerido para a transcrição de todos os genes. NURF (Tabela 28-2) é um outro complexo enzimático dependente de ATP, que remodela a cromatina de formas que complementam e sobrepõem a atividade da SWI/SNF. Esses complexos enzimáticos desempenham um papel importante no preparo de uma região da cromatina para a transcrição ativa.

Muitos promotores eucarióticos são regulados positivamente

Como já mencionado, as RNA polimerases eucarióticas possuem pouca ou nenhuma afinidade intrínseca para os seus promotores; a iniciação da transcrição é, quase sempre, dependente da ação de múltiplas proteínas ativadoras. Uma razão importante para a aparente predominância da regulação positiva parece óbvia: o armazenamento do DNA, dentro da cromatina, efetivamente torna a maioria dos promotores inacessíveis, de forma que os genes estão normalmente silenciosos na ausência de outra regulação. A estrutura da cromatina afeta o acesso a alguns promotores mais do que a outros, entretanto, os repressores que se ligariam ao DNA para evitar o acesso da RNA polimerase (regulação negativa) seriam com freqüência simplesmente redundantes. Outros fatores estão em cena no uso da regulação positiva, e a especulação geralmente se centra em dois: o grande tamanho dos genomas eucarióticos e a maior eficiência da regulação positiva.

Primeiro, a ligação não específica ao DNA das proteínas reguladoras torna-se um problema mais importante nos genomas muito maiores dos eucariotos superiores. E a probabilidade de que a ligação a uma seqüência específica ocorra aleatoriamente em sítios não apropriados também aumenta com o tamanho do genoma. A especificidade para a ativação transcricional pode ser melhorada se cada uma das várias proteínas reguladoras positivas puder ligar-se a seqüências específicas e, então, formar um complexo. O número médio de sítios regulatórios para os genes num organismo multicelular é provavelmente pelo menos cinco. O requerimento de múltiplas proteínas reguladoras positivas para se ligar a seqüências específicas do DNA reduz enormemente a probabilidade da ocorrência aleatória da justaposição funcional de todos os sítios de ligação necessários. Em princípio, uma estratégia semelhante poderia ser usada por múltiplos elementos regulatórios negativos, mas isso nos levaria diretamente à segunda razão para o uso da regulação positiva: ela, simplesmente, é mais eficiente. Se os 100.000 genes no genoma humano fossem regulados negativamente, cada célula teria de sin-

Tabela 28-2 – Alguns complexos enzimáticos que catalisam as alterações estruturais da cromatina durante a transcrição

Complexo enzimático*	Estrutura oligomérica	Fonte	Atividades
GCN5-ADA2-ADA3	3 polipeptídeos	Levedura	GCN5 possui atividade HAT do tipo A
SAGA/PCAF	> 20 polipeptídeos	Eucariotos	Inclui GCN5-ADA2-ADA3
SWI/SNF	> 11 polipeptídeos; M_r 2×10^6	Eucariotos	Remodelador do nucleossomo dependente de ATP
NURF	4 polipeptídeos; M_r 500.000	Drosófila	Remodelador do nucleossomo dependente de ATP
CAF1	> 2 polipeptídeos	Homem; drosófila	Responsável pela ligação das histonas H3 e H4 ao DNA
NAP1	1 polipeptídeo; M_r 125.000	Largamente distribuída nos eucariotos	Responsável pela ligação das histonas H2A e H2B ao DNA

*As abreviações usadas para identificar os genes eucarióticos e as proteínas são freqüentemente mais confusas ou obscuras do que aquelas usadas para as bactérias. O complexo das proteínas GCN5 ("*g*eneral *c*ontrol *n*onderepressible") e ADA ("*a*lteration/*d*eficiency *a*ctivation") foi descoberto durante a investigação da regulação dos genes do metabolismo do nitrogênio na levedura. Essas proteínas podem ser parte do complexo maior SAGA. SAGA (*SPF*, *ADA*2,3, *GCN*5, *A*cetiltransferase) é um complexo da levedura; o seu equivalente no homem é o PCAF ("*p*300/*CBP*-*a*ssociated *f*actor"). SWI foi descoberta como uma proteína requerida para a expressão de certos genes envolvidos na mudança ("*sw*itching") do tipo de gameta na levedura, e SNF ("*s*ucrose *n*on*f*ermenting"), como um fator para a expressão do gene da levedura para a sacarose. Estudos subseqüentes revelaram que as proteínas múltiplas SWI e SNF atuam num complexo. O complexo SWI/SNF possui um papel na expressão de uma grande classe de genes e foi encontrado em muitos eucariotos, incluindo o homem. NURF ("*nu*clear *re*modeling *f*actor"); CAF1 ("*c*hromatin *a*ssembly *f*actor") e NAP1 ("*n*ucleossome *a*ssembly *p*rotein").

tetizar, durante todo tempo, quase 100.000 repressores diferentes (ou muitas vezes aquele número, se elementos regulatórios múltiplos fossem usados para cada promotor), em concentrações suficientes para permitir a ligação específica a cada um dos genes "não desejados". Na regulação positiva, a maioria dos genes está normalmente inativa (ou seja, a RNA polimerase não se liga aos promotores) e a célula tem de sintetizar apenas as proteínas ativadoras necessárias para promover a transcrição de um conjunto de genes requeridos naquela célula.

Apesar desses argumentos, há exemplos de regulação negativa nos eucariotos, da levedura ao homem.

A ligação ao DNA de transativadores e co-ativadores facilita a montagem dos fatores gerais de transcrição

Para começar nossa exploração da regulação da expressão gênica nos eucariotos, iniciamos com uma discussão da RNA polimerase II, a enzima responsável pela síntese dos mRNAs eucarióticos. Embora a maioria dos promotores da RNA polimerase II inclua as seqüências TATA e Inr (iniciadora) com seus espaçamentos-padrão (Veja Fig. 26-8), elas variam intensamente tanto no número quanto na localização das seqüências adicionais requeridas para a regulação da transcrição. Essas seqüências regulatórias adicionais são usualmente chamadas de **intensificadoras** ("enhancers"), nos eucariotos superiores, e **seqüências ativadoras à montante** (**UASs**, "*u*pstream *a*ctivator *s*equences"), na levedura. Um intensificador típico pode ser encontrado centenas ou mesmo milhares de pares de bases a montante do sítio de início da transcrição, ou pode estar mesmo a jusante do sítio de início da transcrição, dentro do próprio gene. Quando ligado pelas proteínas reguladoras apropriadas, um intensificador aumenta a transcrição nos promotores próximos, independentemente da sua orientação no DNA. As UASs da levedura funcionam de maneira semelhante, embora, geralmente, elas precisem estar posicionadas a montante e dentro de algumas centenas de pares de bases do sítio do início da transcrição. Um promotor médio da RNA polimerase II pode ser afetado por meia dúzia dessas seqüências regulatórias, e mesmo promotores mais complexos são bastante comuns.

Três classes de proteínas estão envolvidas na ativação da transcrição

A ligação bem-sucedida da holoenzima ativa da RNA polimerase II em um dos seus promotores, usualmente, requer a ação de outras proteínas (Fig. 28-29), de três tipos. A primeira classe compreende os **fatores de transcrição basais** (veja Fig. 26-9 e Tabela 26-1) requeridos para cada promotor da RNA polimerase II. A segunda classe inclui os **transativadores de ligação ao DNA**, que se ligam aos intensificadores ou UASs e facilitam a transcrição. A terceira classe é um grupo de proteínas chamadas de **co-ativadores**, que agem indiretamente, não pela ligação ao DNA, e são requeridas para a comunicação essencial entre os transativadores de ligação ao DNA e o complexo composto pela RNA polimerase e pelos fatores de transcrição gerais. Além disso, uma variedade de proteínas repressoras podem interferir com a comunicação entre a RNA polimerase e os transativadores de ligação ao DNA, resultando na repressão da transcrição (Fig. 28-29b). Mais detalhes sobre os complexos protéicos são mostrados na Figura 28-29 e sobre as maneiras pelas quais eles interagem para ativar a transcrição são mostrados a seguir.

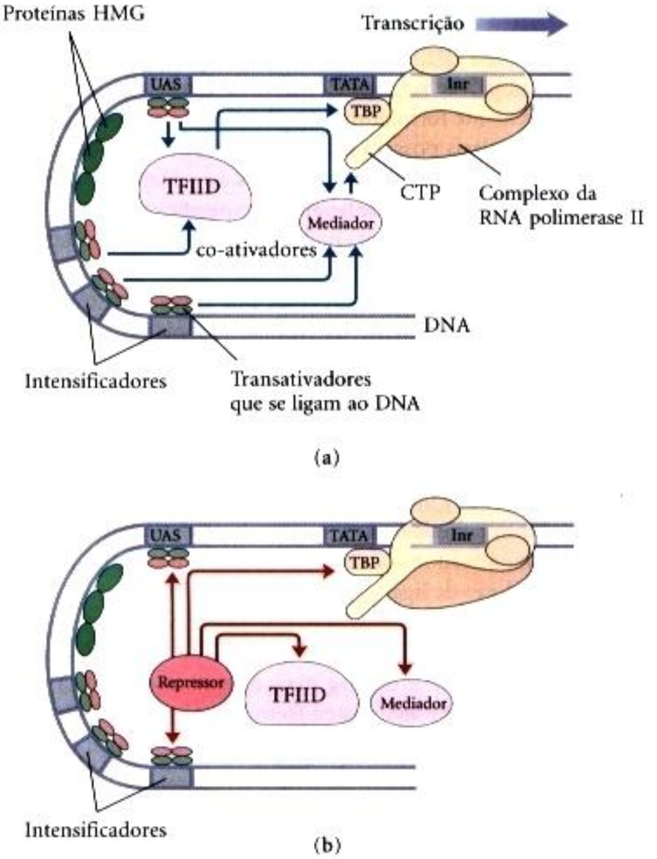


Figura 28-29 – Promotores eucarióticos e proteínas reguladoras. A RNA polimerase II e os seus fatores de transcrição gerais associados formam um complexo de pré-iniciação na seqüência TATA e no sítio Inr de promotores de mesma origem, um processo facilitado pelos transativadores de ligação ao DNA, agindo por meio da TFIID e/ou mediador. (**a**) O que se mostra aqui é um promotor composto com elementos de seqüência e complexos protéicos típicos encontrados tanto em levedura quanto em eucariotos superiores. O domínio carboxiterminal (CTD) da RNA polimerase II (veja Fig. 26-9) é um ponto importante de interação com o mediador e com outras proteínas do complexo. Os complexos protéicos envolvidos na acetilação da histona e no remodelamento da cromatina não são mostrados. Para os transativadores de ligação ao DNA, os domínios de ligação ao DNA estão mostrados em verde; os domínios ativadores, em vermelho. As interações, simbolizadas pelas setas azuis, são discutidas no texto. (**b**) Uma grande variedade de repressores transcricionais eucarióticos funciona por uma série de mecanismos. Alguns se ligam diretamente ao DNA, deslocando um complexo protéico requerido para a ativação, outros interagem com várias partes da transcrição ou dos complexos de ativação para prevenir a ativação. Pontos possíveis de interação são indicados com setas vermelhas.

Proteína de ligação à TATA. A proteína de ligação à TATA (TBP, "*TATA b*inding *p*rotein") é o primeiro componente a se ligar na montagem do complexo de pré-iniciação na seqüência TATA de um promotor típico da RNA polimerase II. Esse complexo inclui os fatores de transcrição gerais TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH; RNA polimerase II; e talvez TFIIA. Embora requerido pela transcrição, esse complexo mínimo de pré-iniciação é relativamente insensível à regulação e pode não se formar se o promotor for obscurecido dentro da cromatina. A regulação é imposta pelos transativadores e co-ativadores.

Transativadores de ligação ao DNA. Os requerimentos para os transativadores variam muito de um promotor a outro. Poucos transativadores são conhecidos como facilitadores da transcrição de centenas de promotores, enquanto outros são específicos para poucos promotores. Muitos transativadores são sensíveis à ligação de moléculas sinais, fornecendo a capacidade de ativar ou desativar a transcrição em resposta a uma alteração no ambiente celular. Alguns intensificadores com os quais os transativadores de ligação ao DNA se associam estão bem distantes da seqüência TATA do promotor. Como os transativadores de ligação ao DNA funcionam a distância? A resposta, em muitos casos, parece ser aquela, indicada anteriormente, que o DNA interveniente forma uma alça de modo que as várias proteínas do complexo possam interagir diretamente. A formação da alça é facilitada por certas proteínas não-histonas, que são abundantes na cromatina e se ligam não especificamente ao DNA. Esse grupo de proteínas de alta mobilidade (HMG, "*h*igh *m*obility group") (o nome se refere à sua mobilidade eletroforética em géis de poliacrilamida) desempenha um papel estrutural importante no remodelamento da cromatina e na ativação transcricional.

Complexo de proteínas co-ativadoras. A maioria das transcrições requer a presença de um complexo de proteínas adicionais. Algumas das proteínas reguladoras mais importantes do complexo que interage com a RNA polimerase II têm sido definidas tanto geneticamente quanto bioquimicamente. Esses complexos co-ativadores atuam como um intermediário entre os transativadores de ligação ao DNA e a RNA polimerase.

O co-ativador mais bem caracterizado é o fator de transcrição TFIID. Na maioria dos eucariotos, TFIID é um grande complexo que inclui TBP e dez ou mais fatores associados à TBP (TAFs, do inglês "*TBP-a*ssociated *f*actors"). Algumas TAFs assemelham-se a histonas e podem desempenhar um papel no deslocamento de nucleossomos durante a ativação da transcrição. Muitos transativadores de ligação ao DNA podem facilitar a iniciação da transcrição, interagindo com uma ou mais TAFs.

Um outro co-ativador importante, encontrado na levedura, consiste em cerca de 20 polipeptídeos num complexo protéico chamado de **mediador**. Ele se liga fortemente ao domínio carboxiterminal (CTD, "*c*arboxyl-*t*erminal *d*omain") da RNA polimerase II da levedura. Homólogos de algumas proteínas do mediador têm sido identificados nos eucariotos, da levedura ao homem. Não sabemos se as funções do TFIID e do mediador são distintas, complementares ou superpostas. Acredita-se que alguns transativadores de ligação ao DNA interajam com um ou mais componentes do complexo do mediador da mesma forma que TFIID. Complexos co-ativadores funcionam na seqüência TATA dos promotores ou próximos a ela.

Coreografia da ativação transcricional. Podemos, agora, começar a colocar junto a seqüência de eventos da ativação transcricional num promotor da RNA polimerase II típico. Primeiro, o remodelamento crucial da cromatina se realiza em etapas. Alguns transativadores de ligação ao DNA possuem afinidade significante para os sítios de ligação, mesmo quando eles estão dentro da cromatina condensada. A ligação de um transativador pode facilitar a ligação de outros, deslocando gradualmente alguns nucleossomos.

Os transativadores ligados podem então interagir diretamente com as HATs e/ou complexos enzimáticos, como o SWI/SNF, acelerando o remodelamento da cromatina circundante. Dessa forma, um transativador ligado pode tirar outros componentes necessários para um remodelamento adicional da cromatina e facilitar a transcrição de genes específicos. Os transativadores ligados, geralmente agindo por meio de complexos como o TFIID ou o mediador, estabilizam a ligação da RNA polimerase II e seus fatores de transcrição associados e facilitam muito a formação do complexo de pré-iniciação da transcrição. A complexidade, nesses circuitos regulatórios, é a regra em vez da exceção, com transativadores de ligação ao DNA múltiplos, promovendo a transcrição.

Ativação transcricional reversível. Embora, mais raramente, algumas proteínas reguladoras que se ligam aos promotores da RNA polimerase II possam agir como repressores, inibindo a formação dos complexos de pré-iniciação (Fig. 28-29b). Alguns transativadores podem adotar conformações múltiplas, capacitando-os a funcionar como ativadores transcricionais ou repressores. Por exemplo, alguns receptores do hormônio esteróide (descritos posteriormente neste capítulo) funcionam no núcleo como transativador de ligação ao DNA, estimulando a transcrição de certos genes quando um sinal hormonal esteróide particular estiver presente. Quando o hormônio está ausente, as proteínas receptoras revertem para uma conformação na qual atuam como um repressor, *impedindo* a formação dos complexos de pré-iniciação. Em alguns casos, essa repressão envolve a interação com as histonas deacilases e outras proteínas que ajudam a restaurar a cromatina circundante ao seu estado transcricionalmente inativo.

Os genes requeridos para o metabolismo da galactose na levedura estão sujeitos tanto à regulação positiva quanto à negativa

Alguns dos princípios gerais descritos anteriormente podem ser ilustrados por um circuito regulatório eucariótico bem estudado (Fig. 28-30). As enzimas requeridas para a importação da galactose e o seu metabolismo em levedura são codificadas por genes dispersos em vários cromossomos (Tabela 28-3). Cada um dos genes *GAL* é transcrito separadamente, e as células da leve-

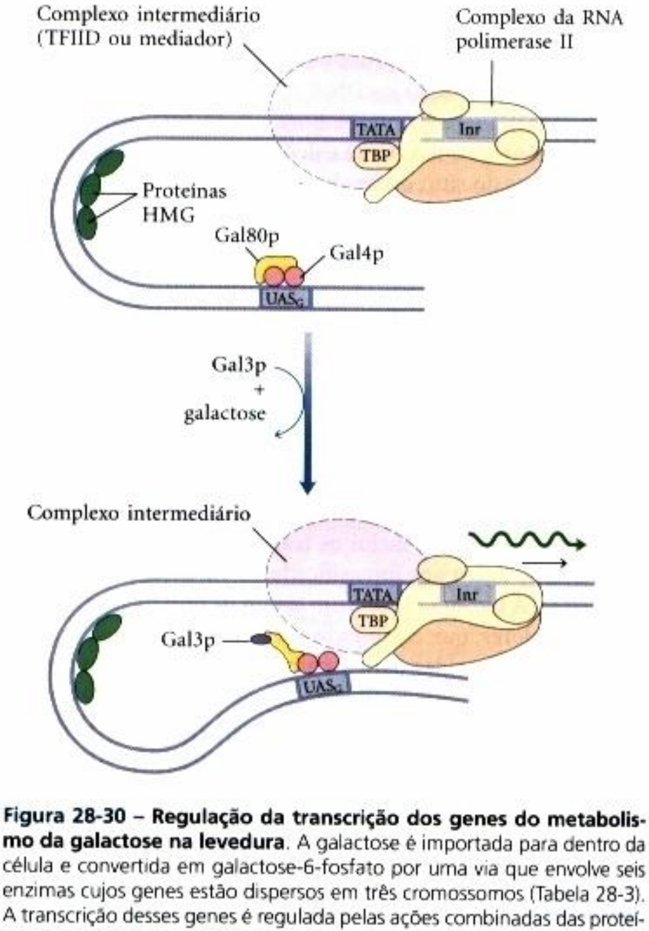


Figura 28-30 – Regulação da transcrição dos genes do metabolismo da galactose na levedura. A galactose é importada para dentro da célula e convertida em galactose-6-fosfato por uma via que envolve seis enzimas cujos genes estão dispersos em três cromossomos (Tabela 28-3). A transcrição desses genes é regulada pelas ações combinadas das proteínas Gal4p, Gal80p e Gal3p, com Gal4p desempenhando o papel central de transativador de ligação ao DNA. O complexo Gal4p/Gal80p é inativo na ativação gênica. A ligação da galactose à Gal3p e sua interação com Gal80p produzem uma alteração conformacional em Gal80p que permite que Gal4p funcione na ativação da transcrição.

Tabela 28-3 – Genes do metabolismo da galactose na levedura

	Função protéica	Localização cromossômica	Tamanho protéico (número de resíduos)	Expressão protéica relativa em diferentes fontes de carbono		
				Glicose	Glicerol	Galactose
Genes regulados						
GAL1	Galactoquinase	II	528	–	–	+++
GAL2	Galactose permease	XII	574	–	–	+++
PGM2	Fosfoglicomutase	XIII	569	+	+	++
GAL7	Galactose-1-fosfato uridiltransferase	II	365	–	–	+++
GAL10	UDP-glicose 4-epimerase	II	699	–	–	+++
MEL1	α-Galactosidase	II	453	–	+	++
Genes regulatórios						
GAL3	Indutor	IV	520	–	+	++
GAL4	Ativador transcricional	XVI	881	+/–	+	+
GAL80	Inibidor transcricional	XIII	435	+	+	++

Adaptado de Reece R & Platt A (1997) Signaling activation and repression of RNA polimerase II transcription in yeast. *Bioessays* **19**, 1001-1010.

dura não possuem operons como aqueles das bactérias. Entretanto, todos os genes *GAL* possuem promotores semelhantes e são regulados coordenadamente por um conjunto de proteínas comuns. Os promotores para os genes *GAL* consistem de seqüências TATA e Inr, bem como uma seqüência ativadora a montante (UAS_G) reconhecida por um ativador transcricional de ligação ao DNA chamado de proteína Gal4 (Gal4p). A regulação da expressão gênica pela galactose envolve uma influência mútua entre Gal4p e duas outras proteínas, Gal80p e Gal3p (Fig. 28-30).

Gal80p forma um complexo com Gal4p, prevenindo Gal4p de funcionar como um ativador dos promotores de *GAL*. Quando a galactose estiver presente, ela liga-se a Gal3p, que então interage com Gal80p, liberando Gal4p para funcionar como um ativador nos vários promotores *GAL*.

Outros complexos protéicos também possuem um papel na ativação transcricional dos genes *GAL*. Estes podem incluir o complexo SAGA para a acetilação da histona, o complexo SWI/SNF para o remodelamento da histona e o complexo mediador. A Figura 28-31 fornece uma idéia da complexidade das interações protéicas em todo o processo da ativação transcricional nas células eucarióticas.

A glicose é a fonte de carbono preferida para a levedura, como o é para as bactérias. Quando a glicose está presente, a maioria dos genes *GAL* estão reprimidos, estando a galactose presente ou não. O sistema regulatório da *GAL*, descrito anteriormente, é efetivamente anulado por um sistema complexo de repressão catabólica que inclui várias proteínas, não descritas na Figura 28-31.

Transativadores de ligação ao DNA possuem uma estrutura modular

Os transativadores de ligação ao DNA tipicamente possuem um domínio estrutural distinto para a ligação específica ao DNA e um ou mais domínios adicionais para a ativação transcricional ou para a interação com outras proteínas reguladoras. A interação de duas proteínas reguladoras é freqüentemente mediada por domínios contendo motivos de zíperes de leucina (Fig. 28-14) ou hélice-alça-hélice (Fig. 28-15). Consideraremos aqui três tipos distintos de domínios estruturais usados na ativação pelos transativadores de ligação ao DNA (Fig. 28-32a): Gal4p, Sp1 e CTF1.

Gal4p contém uma estrutura semelhante ao dedo de zinco no seu domínio de ligação ao DNA próxima ao aminoterminal; esse domínio possui seis resíduos de Cys, que coordenam dois Zn^{2+}. A proteína funciona como um homodímero (com a dimerização mediada pelas interações entre duas espiras espiraladas) e se liga à UAS_G, uma seqüência palindrômica de cerca de

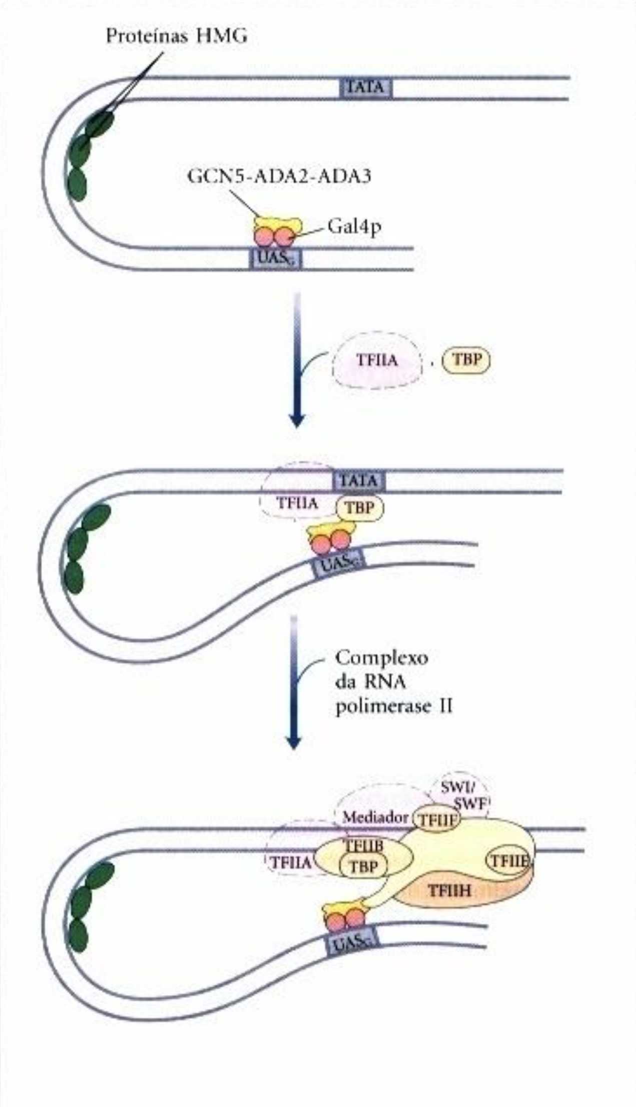


Figura 28-31 – Complexos protéicos envolvidos na ativação da transcrição de um grupo de genes eucarióticos relacionados. O sistema *GAL* é mostrado para ilustrar a complexidade desse processo, mas nem todos esses complexos protéicos já são conhecidos como afetando a transcrição do gene *GAL*. Observe que muitos dos complexos (tais como SWI/SNF, GCN5-ADA2-ADA3, mediador) afetam a transcrição de muitos genes. Os complexos montam-se passo a passo. Os transativadores de ligação ao DNA se ligam primeiro, depois começam as proteínas adicionais dos complexos necessárias para remodelar a cromatina e permitir a transcrição.

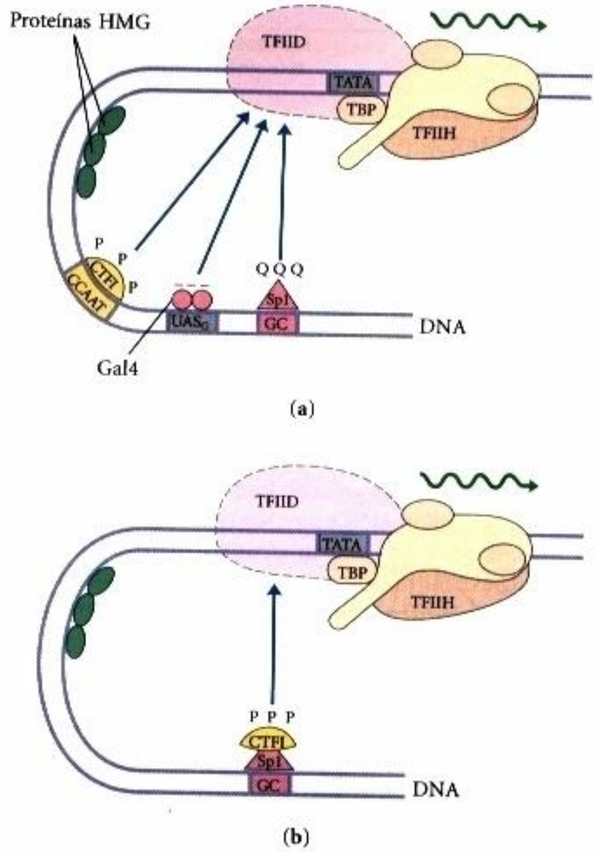


Figura 28-32 – Transativadores de ligação ao DNA. (**a**) Transativadores de ligação ao DNA típicos, como CTF1, Gal4p e Sp1, possuem um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação. A natureza do domínio de ativação está indicada por símbolos: – – –, acídico; QQQ, rico em glutamina; PPP, rico em prolina. Algumas ou todas essas proteínas podem ativar a transcrição pela interação com complexos intermediários, como o TFIID ou o mediador. Observe que os sítios de ligação ilustrados aqui não são geralmente encontrados juntos, próximos de nenhum gene. (**b**) Uma proteína quimérica, com o domínio de ligação ao DNA da Sp1 e o domínio de ativação do CTF1, ativa a transcrição se uma seqüência GC estiver presente.

17 pares de bases de comprimento. Gal4p possui um domínio de ativação separado com muitos resíduos de aminoácidos ácidos. Experimentos, substituindo uma variedade de seqüências peptídicas diferentes pelo **domínio de ativação acídico** da Gal4p, sugerem que a natureza acídica desse domínio seja crítica para a sua função, embora a sua seqüência de aminoácidos possa variar consideravelmente.

Sp1 (M_r 80.000) é um transativador de ligação ao DNA para um grande número de genes nos eucariotos superiores. Seu sítio de ligação ao DNA, a seqüência GC (seqüência de consenso GGGCGG), é usualmente bem próxima da seqüência TATA. O domínio de ligação ao DNA da proteína Sp1 está próximo do seu terminal carboxila e contém três dedos de zinco. Dois outros domínios em Sp1 funcionam na ativação. Eles são caracterizados pelo fato de 25% dos seus resíduos de aminoácidos serem Gln. Uma grande variedade de outras proteínas ativadoras também possuem esses **domínios ricos em glutamina.**

O fator de transcricional 1 de ligação à CCAAT (CTF1, "*C*CAAT-binding *t*ranscripcional *f*actor *1*") pertence a uma família de transativadores de ligação ao DNA que se ligam a uma seqüência chamada de sítio CCAAT (sua seqüência de consenso é TGGN$_6$GCCAA, em que N é qualquer nucleotídeo). O domínio de ligação do CTF1 contém muitos resíduos de aminoácidos básicos, e a região de ligação é provavelmente arranjada como uma α-hélice. Esta proteína não possui um motivo hélice-alça-hélice ou dedo de zinco; seu mecanismo de ligação ao DNA permanece a ser clarificado. CTF1 possui um **domínio de ativação rico em prolina**, com a Pro representando mais de 20% dos resíduos de aminoácidos.

Os domínios discretos de ativação e de ligação ao DNA dessas proteínas reguladoras freqüentemente atuam completamente independente, como têm sido demonstrados em experimentos chamados de "troca de domínio". O domínio de ativação rico de prolina da CTF1 pode ser unido por meio da engenharia genética (Capítulo 29) ao domínio de ligação ao DNA da Sp1, para criar uma proteína que, semelhantemente à Sp1 normal, liga-se às seqüências GC no DNA e ativa a transcrição de um promotor próximo (Fig. 28-32b). O domínio de ligação ao DNA da Gal4p foi da mesma forma substituído experimentalmente pelo domínio de ligação ao DNA do repressor procariótico LexA (da resposta SOS; Fig. 28-24). Essa proteína quimérica nem se liga às seqüências UAS$_G$ e nem ativa os genes *GAL* da levedura (como faria a Gal4p normal), a menos que a seqüência UAS$_G$ no DNA seja substituída pelo sítio de reconhecimento da LexA.

A expressão gênica eucariótica pode ser regulada por sinais intercelulares e intracelulares

Os efeitos dos hormônios esteróides (e dos hormônios tireoideanos e retinóides, que compartilham o seu modo de ação) fornecem outros exemplos bem estudados da modulação das proteínas reguladoras eucarióticas pela interação direta com sinais moleculares. Ao contrário de outros tipos de hormônios, os do tipo esteróide não se ligam a receptores da membrana plasmática celular. Eles interagem com receptores intracelulares que são, por sua vez, transativadores transcricionais. Hormônios esteróides, muito hidrofóbicos para se dissolverem facilmente no sangue (estrógeno, progesterona e cortisol, por exemplo), circulam em proteínas transportadoras específicas, desde o ponto de sua liberação até os seus tecidos-alvo. No tecido-alvo, os hormônios passam através da membrana plasmática por difusão simples e se ligam à sua proteína receptora específica no núcleo (Fig. 28-33). O complexo hormônio-receptor atua ligando-se a seqüências de DNA altamente específicas chamadas de **elementos da resposta hormonal** (HREs, "*h*ormone *r*esponse *e*lements") e alteram a expressão gênica. A ligação hormonal desencadeia alterações na conformação das proteínas do receptor de forma que elas se tornam capazes de interagir com fatores de transcrição adicionais. O complexo hormônio-receptor ligado pode ou aumentar ou suprimir a expressão dos genes adjacentes.

As seqüências de DNA (HREs) às quais os complexos hormônio-receptor se ligam são semelhantes em comprimento e arranjo, mas diferem em seqüência, para os vários hormônios esteróides. Cada receptor possui uma seqüência HRE consenso (Tabela 28-4) à qual o complexo hormônio-receptor se liga bem, cada seqüência consenso consistindo em duas seqüências de seis nucleotídeos ou contíguas ou separadas por três nucleotídeos em arranjos repetitivos ou palindrômicos. Os receptores hormonais possuem um domínio de ligação ao DNA altamente conservado com dois dedos de zinco (Fig. 28-33). O complexo hormônio-receptor se liga ao DNA como um dímero, com os domínios dedo de zinco de cada monômero reconhecendo uma das seqüências de seis nucleotídeos. A habilidade de um certo hormônio de agir através do complexo hormônio-receptor para alterar a expressão de um gene específico depende da seqüência exata do HRE, de sua posição relativa ao gene e do número de HREs associadas com o gene.

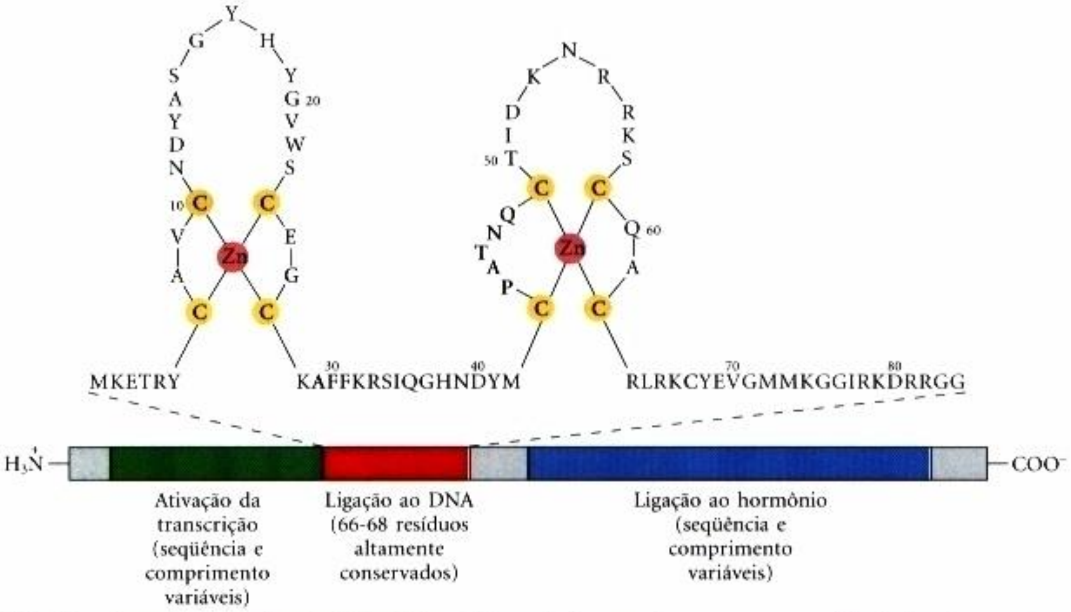

Zn
Zn
MKETRY
KAFFKRSIQGHNDYM
RLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGG
10
20
30
40
50
60
70
80
H₃N⁺
COO⁻
Ativação da transcrição (seqüência e comprimento variáveis)
Ligação ao DNA (66-68 resíduos altamente conservados)
Ligação ao hormônio (seqüência e comprimento variáveis)

Figura 28-33 – Receptores hormonais esteróides típicos. Estas proteínas receptoras possuem um sítio de ligação para o hormônio, um domínio de ligação ao DNA e uma região que ativa a transcrição do gene regulado. O domínio de ligação ao DNA altamente conservado possui dois dedos de zinco. A seqüência mostrada aqui é a do receptor estrogênio, mas os resíduos em negrito são comuns a todos os receptores dos hormônios esteróides.

Tabela 28-4 – Elementos da resposta hormonal ligados por receptores hormonais do tipo esteróide

Receptor	Seqüência consenso de ligação*
Andrógeno	$GG^{A}/_{T}ACAN_2TGTTCT$
Glicocorticóide	$GGTACAN_3TGTTCT$
Ácido retinóico (alguns)	$AGGTCAN_5AGGTCA$
Vitamina D	$AGGTCAN_3AGGTCA$
Hormônio tireoideano	$AGGTCAN_3AGGTCA$
RX[†]	AGGTCANAGGTCANAGGTCANAGGTCA

*N representa qualquer nucleotídeo.

[†] Forma dimero com o receptor do ácido retinóico ou o receptor da vitamina D.

Ao contrário do domínio de ligação ao DNA, a região de ligação do ligante à proteína receptora, sempre no terminal carboxila, é bem específica para o receptor particular. Na região de ligação do ligante, o receptor glicocorticóide é apenas 30% semelhante ao receptor estrogênico e 17% ao receptor do hormônio tireoideano. O tamanho da região de ligação ao ligante varia dramaticamente: no receptor da vitamina D, ele possui apenas 25 resíduos de aminoácidos, enquanto, no receptor mineralocorticóide, ele possui 603 resíduos. Mutações que alteram um aminoácido nessas regiões podem resultar em perda da resposta para um hormônio específico. Algumas pessoas incapazes de responder ao cortisol, à testosterona, à vitamina D ou à tiroxina possuem mutações desse tipo.

A regulação pode ocorrer por meio da fosforilação de fatores de transcrição nuclear

Registramos, no Capítulo 13, que os efeitos da insulina, na expressão gênica, são mediados por uma série de etapas que levam finalmente à ativação de uma proteína quinase no núcleo, que fosforila proteínas de ligação ao DNA específicas e, portanto, altera sua habilidade de agir como fatores de transcrição. Esse mecanismo geral medeia os efeitos de muitos hormônios não-esteróides. Por exemplo, a via β-adrenérgica que leva a níveis elevados de cAMP citosólico e age como um mensageiro secundário nos eucariotos, da mesma forma que em procariotos (veja Figs. 13-11 e 28-18), também afeta a transcrição de um conjunto de genes, cada um dos quais está localizado próximo a uma seqüência de DNA específica chamada de elemento de resposta ao cAMP (CRE, "*c*AMP *r*esponse *e*lement"). A subunidade catalítica da proteína quinase A, liberada quando os níveis de cAMP se elevam (veja Fig. 13-14), entra no núcleo e fosforila uma proteína nuclear, a proteína de ligação ao CRE (CREB). Quando fosforilada, CREB se liga aos CREs próximos a certos genes e atua como um fator de transcrição, iniciando a transcrição desses genes.

Muitos mRNAs eucarióticos estão sujeitos à repressão traducional

A regulação no nível da tradução assume um papel muito mais proeminente nos eucariotos do que nas bactérias e é observado numa série de situações celulares. Em contraste com o forte acoplamento da transcrição e tradução, que ocorre nas bactérias, os transcritos, gerados num núcleo eucariótico, devem ser processados e transportados para o citoplasma antes da tradução. Isso pode impor um atraso significante no aparecimento de uma proteína. Quando um aumento rápido na produção da proteína for necessário, um mRNA traducionalmente reprimido, já no citoplasma, pode ser ativado para a tradução sem atraso. A regulação traducional pode desempenhar um papel especialmente importante na regulação de certos genes eucarióticos muito longos (alguns são medidos em milhões de pares de bases), para os quais a transcrição e o processamento do mRNA podem requerer muitas horas. Alguns genes são regulados tanto nos estágios de transcrição quanto nos da tradução, com o último desempenhando um papel na regulagem fina dos níveis protéicos celulares. Em algumas células anucleadas, como o reticulócito (eritrócitos imaturos), o controle transcricional é inteiramente não disponível e o controle traducional do armazenamento dos mRNAs torna-se essencial. Como será descrito posteriormente neste capítulo, os controles traducionais podem ter também um significado espacial durante o desenvolvimento, em que a regulação da tradução de mRNAs pré-posicionados cria um gradiente local do produto protéico resultante.

Os eucariotos possuem, pelo menos, três mecanismos principais de regulação traducional.

1. Os fatores de iniciação são submetidos à fosforilação por várias proteínas quinases. As formas fosforiladas são freqüentemente menos ativas e levam a uma depressão geral da tradução na célula.
2. Algumas proteínas se ligam diretamente ao mRNA e atuam como repressores traducionais, muitas das quais se ligam a sítios específicos na região 3′ não traduzida (3′UTR, "*3′ un*translated *r*egion"). Assim posicionadas, essas proteínas interagem com outros fatores de iniciação da tradução ligados ao mRNA ou com a subunidade ribossômica 40S para prevenir a iniciação da tradução (Fig. 28-34; compare esta com a Fig. 27-24).

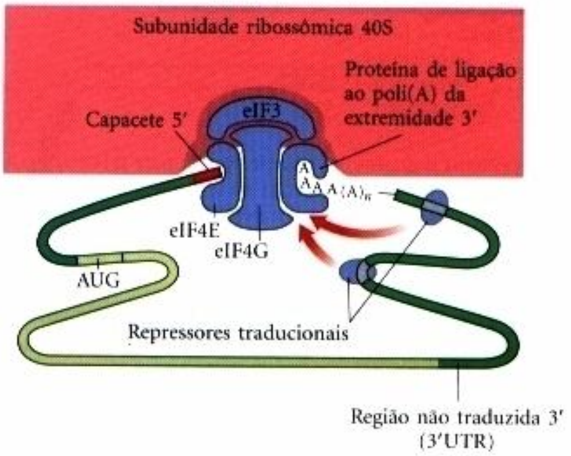

Subunidade ribossômica 40S
Proteína de ligação ao poli(A) da extremidade 3′
Capacete 5′
eIF3
A A A A (A)n
eIF4E
eIF4G
AUG
Repressores traducionais
Região não traduzida 3′ (3′UTR)

Figura 28-34 – Regulação traducional do mRNA eucariótico. Um mecanismo importante para a regulação traducional nos eucariotos envolve a ligação de repressores traducionais (proteínas de ligação ao RNA) em sítios específicos na região 3′ não traduzida (3′UTR) do mRNA. Essas proteínas interagem com fatores de iniciação eucarióticos ou com o ribossomo (veja Fig. 27-24) para prevenir ou diminuir a tradução.

3. Proteínas de ligação, presentes nos eucariotos da levedura aos mamíferos, rompem a interação entre eIF4E e eIF4G (veja Fig. 27-24). As versões nos mamíferos são chamadas de 4E-BPs (abreviatura para a expressão inglesa "eIF*4E b*inding *p*roteins"). Quando o crescimento celular for lento, essas proteínas limitam a tradução, ligando-se ao sítio do eIF4E, que normalmente interage com o eIF4G. Quando o crescimento celular reinicia ou aumenta em resposta a fatores de crescimento ou a outros estímulos, as proteínas de ligação são inativadas pela proteína quinase dependente de fosforilação.

A variedade dos mecanismos de regulação traducional fornecem flexibilidade, permitindo focalizar a repressão de uns poucos mRNAs ou a regulação global de toda a tradução celular.

A regulação traducional tem sido particularmente bem estudada nos reticulócitos. Um mecanismo importante, nessas células, envolve eIF2, o fator de iniciação que se liga ao tRNA iniciador e o conduz para o ribossomo; quando o MetRNA se liga ao sítio P, o fator eIF2B se liga ao eIF2, reciclando-o com a ajuda da ligação e hidrólise do GTP. A maturação do reticulócito inclui a destruição do núcleo celular, deixando atrás uma membrana plasmática empacotada com hemoglobina. RNAs mensageiros, depositados no citoplasma antes da perda do núcleo, permitem a substituição da hemoglobina, conforme for requerido. Quando o reticulócito se torna deficiente em ferro ou heme, a tradução do mRNA da globina é reprimida. Uma proteína quinase chamada de HCR (do inglês "*h*emin-*c*ontrolled *r*epressor") é ativada, catalisando a fosforilação do eIF2. Na sua forma fosforilada, eIF2 forma um complexo estável com eIF2B que seqüestra o eIF2, tornando-o não disponível para a participação na tradução. Dessa forma, o reticulócito coordena a síntese da globina com a disponibilidade do heme.

Muitos exemplos adicionais da regulação traducional foram encontrados no estudo do desenvolvimento de organismos multicelulares, um tópico ao qual voltaremos agora.

O desenvolvimento é controlado por uma cascata de proteínas reguladoras

Pela absoluta complexidade e intrincada coordenação, os padrões da regulação gênica, induzidos pelo desenvolvimento de um zigoto num animal ou planta multicelular, não têm iguais. O desenvolvimento requer transições na morfologia e na composição de proteínas que dependem de alterações fortemente coordenadas na expressão do genoma do organismo. Mais genes são expressos durante o início do desenvolvimento do que em qualquer outra parte do ciclo da vida. Por exemplo, o oócito do ouriço do mar possui cerca de 18.500 mRNAs *diferentes*, comparados com cerca de 6.000 mRNAs diferentes nas células dos tecidos diferenciados típicos. Os mRNAs, no oócito, dão origem a uma cascata de eventos que regulam a expressão de muitos genes tanto no espaço quanto no tempo.

Vários animais têm surgido como sistemas modelos importantes para o estudo do desenvolvimento, porque eles são fáceis de manter num laboratório e possuem tempo de geração relativamente curto. Eles incluem os nematodos, a mosca das frutas, o peixe-zebra, o camundongo e a planta *Arabidopsis*. Esta discussão focalizará o desenvolvimento da mosca das frutas. Nossa compreensão dos eventos moleculares que ocorrem no desenvolvimento da *Drosophila melanogaster* é particularmente bem avançada e pode ser usada para ilustrar padrões e princípios de significado geral.

O ciclo de vida da mosca das frutas inclui a metamorfose completa na sua progressão de um embrião a um adulto (Fig. 28-35). Entre as características mais importantes do embrião estão a sua **polaridade** (as partes anterior e posterior do animal são facilmente distinguidas, da mesma forma que as partes dorsal e ventral) e o seu **metamerismo** (o corpo do embrião é construído de segmentos serialmente repetidos, cada um com feições características). Durante o desenvolvimento, esses segmentos se tornam organizados em: cabeça, tórax e abdômen. Cada segmento do tórax adulto possui um conjunto de apêndices diferentes. O desenvolvimento desse padrão complexo está sob controle genético, e uma variedade de genes que regulam a forma foi descoberta e afeta dramaticamente a organização do corpo.

O ovo da *Drosophila*, junto com suas 15 células nutritivas, é circundado por uma camada de células foliculares (Fig. 28-36a). À medida que a célula ovo é formada (antes da fertilização), os mRNAs e as proteínas originados nas células nutritivas e foliculares são depositados na célula; alguns deles desempenham um papel crítico no desenvolvimento.

Assim que o ovo fertilizado é botado, o seu núcleo se divide e os descendentes nucleares continuam a se dividir em sincronia a cada 6 a 10min (Fig. 28-36b). As membranas plasmáticas não são formadas em volta desses núcleos, e eles são distribuídos dentro do citoplasma do ovo (ou sincício). Entre o 8º e 11º ciclo de divisões nucleares, o núcleo migra para a camada externa do ovo, formando uma monocamada de núcleos circundando o citoplasma comum rico em gema; este é o blastoderma sincicial.

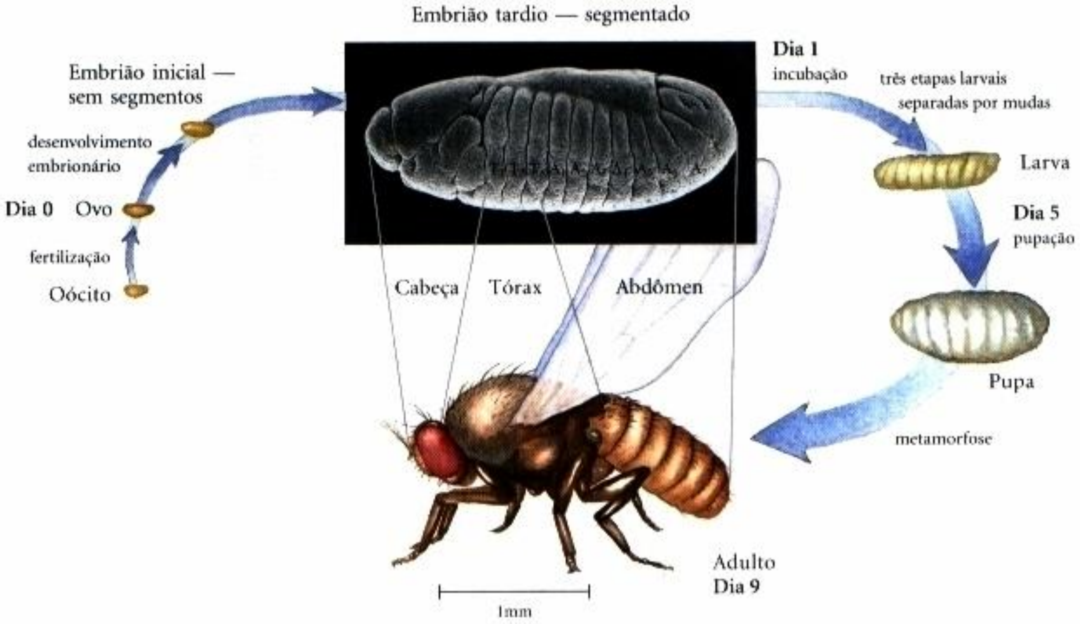

Embrião tardio — segmentado
Embrião inicial — sem segmentos
desenvolvimento embrionário
Dia 0
Ovo
fertilização
Oócito
Dia 1
incubação
três etapas larvais separadas por mudas
Larva
Dia 5
pupação
Pupa
metamorfose
Cabeça
Tórax
Abdômen
Adulto
Dia 9
1mm

Figura 28-35 – O ciclo de vida da mosca das frutas *Drosophila melanogaster*. A metamorfose completa significa que a forma do inseto adulto é radicalmente diferente daquela dos seus estágios imaturos; uma transformação que requer extensas alterações durante o desenvolvimento. Nas etapas embrionárias tardias, são formados segmentos, cada um contendo estruturas especializadas, a partir das quais se desenvolverão os vários apêndices e outras características da mosca adulta.

Depois de algumas divisões adicionais, as invaginações da membrana circundam os núcleos e criam uma camada de células que formam o blastoderma celular. Nessa etapa, os ciclos mitóticos, nas várias células, perde sua sincronia. O destino desenvolvimental das células é determinado pelos mRNAs e proteínas originalmente depositados no ovo pelas células nutritivas e foliculares.

Proteínas cujas concentrações ou atividades locais induzem os tecidos circundantes a desenvolverem uma forma ou estrutura particular são algumas vezes chamadas de **morfogenes**; eles são os produtos de genes que regulam a forma. Como definido por Christiâne Nüsslein-Volhard, Edward B. Lewis e Eric F. Wieschaus, três classes principais de genes que regulam a forma funcionam nos estágios sucessivos do desenvolvimento para especificar as características básicas do corpo do embrião da *Drosophila*: genes maternais, de segmentação e homeóticos. Os **genes maternais** são expressos no ovo não fertilizado, e os **mRNAs maternos** resultantes permanecem dormentes até a fertilização. Estes fornecem a maioria das proteínas necessárias nas fases mais iniciais do desenvolvimento, até que o blastoderma celular seja formado. Algumas das proteínas, codificadas por estes mRNAs, direcionam a organização espacial do desenvolvimento do embrião nas fases iniciais, estabelecendo sua polaridade. Os **genes de segmentação** são transcritos depois da fertilização e direcionam a formação do número apropriado de segmentos do corpo. Pelo menos, três subclasses de genes segmentares atuam em etapas sucessivas: os **genes lacunas** ("gap") dividem o embrião em desenvolvimento em várias regiões grandes, os **genes da regra dos pares** ("pair-rule") juntos aos **genes da polaridade segmentar** definem as 14 listras que se tornam os 14 segmentos presentes num embrião normal. Os **genes homeóticos** são expressos depois. Eles especificam que órgãos e apêndices se desenvolverão nos segmentos particulares do corpo.

Os muitos genes regulatórios, nessas três classes, direcionam o desenvolvimento de uma mosca adulta com uma cabeça, tórax e abdômen, com o número de segmentos apropriados e com os apêndices corretos em cada segmento. Embora a embriogênese leve um dia para se completar, todos esses genes são ativados durante as primeiras quatro horas. Alguns mRNAs e proteínas estão presentes por apenas alguns minutos, em pontos específicos, durante esse período. Alguns dos genes codificam fatores de transcrição que afetam a expressão de outros genes numa espécie de cascata do desenvolvimento. A regulação no nível da tradução também ocorre, e muitos dos genes regulatórios codificam repressores traducionais, a maioria dos quais se liga à 3'UTR do mRNA (Fig. 28-34). Pelo fato de muitos mRNAs serem depositados no ovo antes que a sua tradução seja requerida, a repressão traducional fornece uma avenida especialmente importante para a regulação nas vias do desenvolvimento.

Genes maternais. Alguns genes maternais são expressos dentro das células nutricionais e foliculares, e outros, no próprio ovo. Dentro do ovo não fertilizado da *Drosophila*, os produtos dos genes maternais estabelecem dois eixos: o ântero-posterior e o dorso-ventral. Esses genes definem que regiões do ovo, radialmente simétrico, irão se desenvolver na cabeça e abdômen e no dorso e ventre da mosca adulta. Um evento no desenvolvimento inicial é o estabelecimento dos gradientes de mRNA e proteínas ao longo desses eixos do corpo. Alguns mRNAs maternos possuem produtos protéicos que se difundem através do citoplasma para criar uma distribuição assimétrica. Diferentes células no blastoderma celular herdam, portanto, diferentes quantidades dessas proteínas, colocando as células em vias do desenvolvimento diferentes. Os produtos dos mRNAs maternos incluem ativadores ou repressores transcricionais, bem como repressores traducionais, todos regulando a expressão de outros genes que regulam a forma. Os padrões e as seqüências específicas de expressão gênica, portanto, diferem entre as linhagens celulares, orquestrando finalmente o desenvolvimento de cada estrutura do adulto.

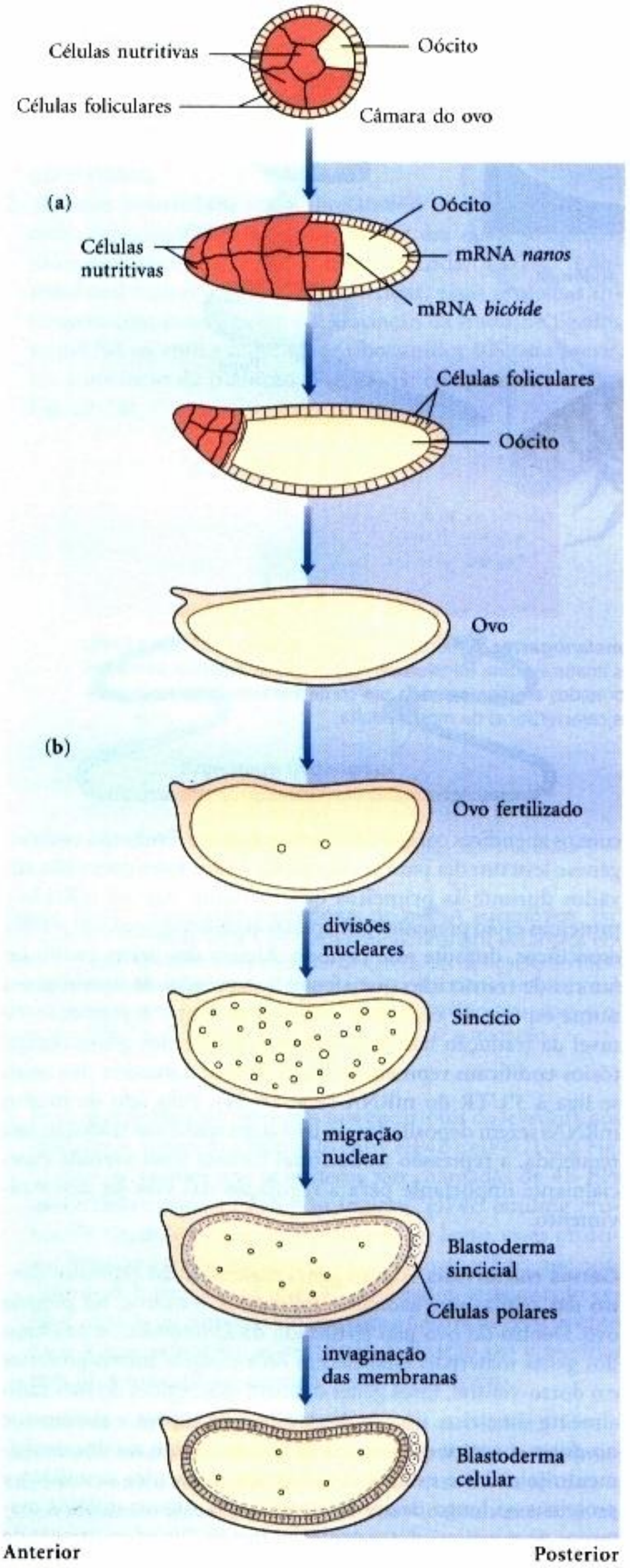


Figura 28-36 – Desenvolvimento inicial na *Drosophila*. (**a**) Desenvolvimento do ovo. mRNAs maternos (incluindo os transcritos gênicos *bicóide* e *nanos*, discutidos no texto) e proteínas são depositados no oócito em desenvolvimento (célula ovo não fertilizada) pelas células nutritivas e foliculares. (**b**) Desenvolvimento embrionário inicial. Os dois núcleos do ovo fertilizado dividem-se sincronicamente num citoplasma comum (sincício), depois migram para a periferia. Invaginações da membrana circundam os núcleos para criar uma monocamada de células na periferia; este é o estágio do blastoderma celular. Durante as divisões nucleares iniciais, vários núcleos da extremidade posterior tornam-se células polares, que mais tarde se tornarão células da linha germinativa.

Christiâne Nüsslein-Volhard

O eixo anterior-posterior é definido, pelo menos em parte, **pelos produtos dos genes *bicóide* e *nanos* da *Drosophila*.** O produto do gene *bicóide* é um morfogene anterior importante e o produto do gene *nanos* é um morfogene posterior. O mRNA do gene *bicóide* é sintetizado pelas células nutritivas e depositado no ovo não fertilizado, próximo ao seu pólo anterior. Christiâne Nüsslein-Volhard descobriu que esse mRNA é traduzido logo depois da fertilização, e a proteína Bicóide se difunde através da célula para criar um gradiente de concentração que irradia do pólo anterior a partir da sétima divisão nuclear (Fig. 28-37a). A proteína Bicóide é um fator de transcrição que ativa a expressão de vários genes segmentares; a proteína contém um homeodomínio (pág. 852). Bicóide é também um repressor traducional que inativa certos mRNAs. As quantidades da proteína Bicóide, em várias partes do embrião, afetam a expressão subseqüente de vários outros genes numa maneira dependente do limiar. Os genes são transcricionalmente ativados ou traducionalmente reprimidos apenas onde a concentração da proteína Bicóide excede o limiar. Alterações na forma do gradiente de concentração do Bicóide produzem efeitos dramáticos na forma do corpo. A falta da proteína Bicóide resulta no desenvolvimento de um embrião com dois abdômens, mas sem cabeça ou tórax (Fig. 28-37b); entretanto, esses embriões se desenvolvem normalmente se uma quantidade adequada do mRNA *bicóide* for injetada no ovo na extremidade apropriada. O gene *nanos* possui um papel análogo, mas o seu mRNA é depositado na extremidade posterior do ovo e o gradiente anterior-posterior tem um pico no pólo posterior. A proteína Nanos é um repressor traducional.

Uma visão mais ampla nos efeitos dos genes maternos revela as linhas gerais de um circuito do desenvolvimento. Além dos mRNAs *bicóide* e *nanos*, que são depositados no ovo assimetricamente, vários outros mRNAs maternos são depositados uniformemente através do citoplasma do ovo. Três desses mRNAs codificam as proteínas Pumilio, Hunchback e Caudal, todas afetadas por *bicóide* e *nanos* (Fig. 28-38). Caudal e Pumilio estão envolvidas no desenvolvimento da extremidade posterior da mosca. Caudal é um ativador transcricional com um homeodomínio; Pumilio é um repressor traducional. A proteína Hunchback desempenha um papel importante no desenvolvimento anterior da mosca e é também um regulador transcricional de uma variedade de genes, em alguns casos um regulador positivo; em outros casos, negativo. Bicóide suprime a tradução do *caudal* na extremidade anterior e age também como um ativador transcricional de *hunchback* no blastoderma celular. Como *hunchback* é expresso tanto a partir de mRNAs maternais quanto de genes no ovo em desenvolvimento, ele é considerado um gene tanto maternal como de segmentação. O resultado das atividades de Bicóide é um aumento na concentração de Hunchback na extremidade anterior do ovo. As proteínas Nanos e Pu-

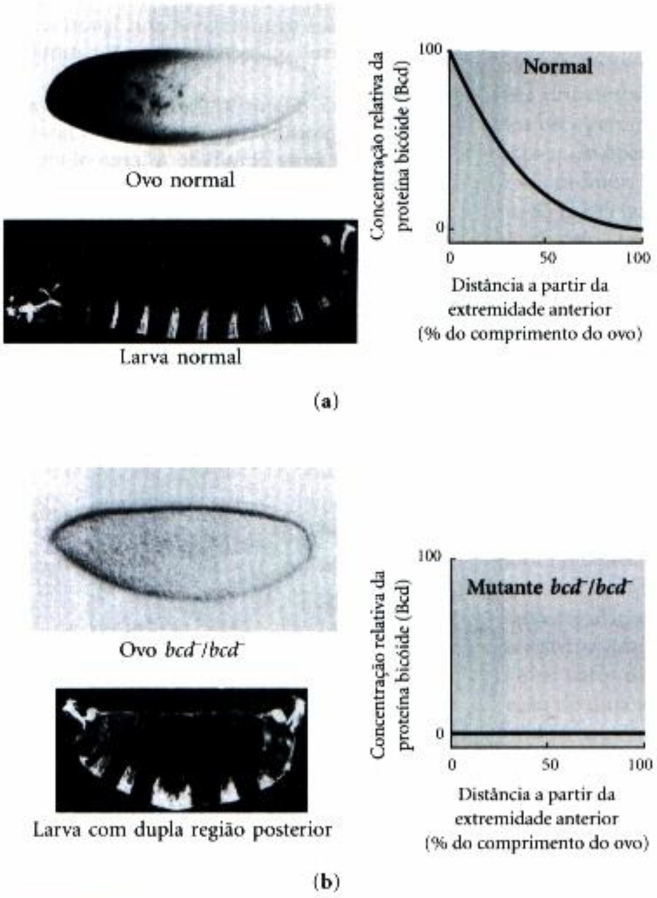


Figura 28-37 – Distribuição de um produto gênico maternal num ovo de *Drosophila*. (**a**) Micrografia de um ovo de *Drosophila* imunologicamente corado, mostrando a distribuição do produto gênico *bicóide (bcd)*. O gráfico mede a intensidade do corante. Esta distribuição é essencial para o desenvolvimento normal das estruturas anteriores do animal. (**b**) Se o gene *bcd* não for expresso pela mãe (mutante bcd^-/bcd^-) e depositado no ovo, o embrião resultante terá duas regiões posteriores.

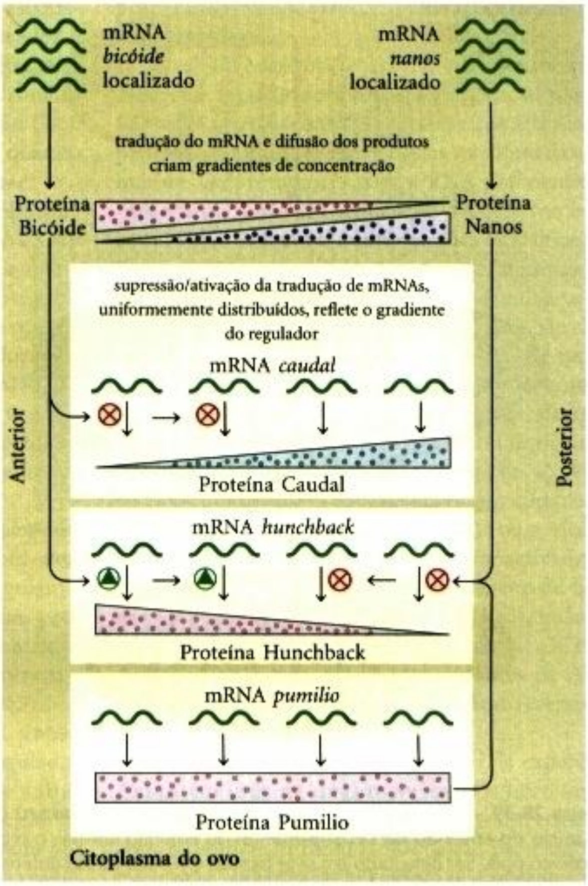


Figura 28-38 – Circuitos regulatórios no eixo anterior-posterior num ovo da *Drosophila*. Os mRNAs *bicóide* e *nanos* são localizados nos pólos anterior e posterior, respectivamente. Os mRNAs *caudal*, *hunchback* e *pumilio* são distribuídos por todo o citoplasma do ovo. Os gradientes das proteínas Bicóide e Nanos levam ao acúmulo da proteína Hunchback na extremidade anterior e da proteína Caudal na extremidade posterior do ovo. Pelo fato de a proteína Pumulio requerer a proteína Nanos para a sua atividade como um repressor traducional de *hunchback*, ela funciona apenas na extremidade posterior.

milio atuam como repressores traducionais de *hunchback*, suprimindo a síntese da sua proteína próximo à extremidade posterior do ovo. Pumilio não funciona na ausência da proteína Nanos, e a expressão do gradiente de Nanos confina a atividade das duas proteínas à região posterior. A repressão traducional do gene *hunchback* leva à degradação do mRNA *hunchback* próximo à extremidade posterior. Entretanto, a falta da proteína Bicóide na extremidade posterior leva à expressão do *caudal*. Dessa maneira, as proteínas Hunchback e Caudal tornam-se assimetricamente distribuídas no ovo.

Genes de segmentação. Os genes das lacunas, das regras dos pares e da polaridade segmentar, três subclasses dos genes segmentares em *Drosophila*, são ativados em etapas sucessivas do desenvolvimento embrionário. A expressão dos genes das lacunas é, geralmente, regulada pelos produtos de um ou mais genes maternais. Pelo menos, alguns dos genes das lacunas codificam fatores de transcrição que afetam a expressão de outros genes de segmentação ou homeóticos (depois).

Um gene de segmentação bem caracterizado é o *fushi tarazu* (*ftz*), da subclasse da regra dos pares. Quando *ftz* é deletado, o embrião desenvolve sete segmentos em vez dos 14 normais, cada segmento com o dobro da largura do normal. A proteína Fushitarazu (Ftz) é um ativador transcricional com um homeodomínio. Os mRNAs e as proteínas derivadas de um gene *ftz* normal acumulam num padrão admirável de 7 listras que circundam os dois terços posteriores do embrião (Fig. 28-39). As listras demarcam as posições dos segmentos que se desenvolvem posteriormente; esses segmentos são eliminados se a função *ftz* for perdida. A proteína Ftz e umas poucas proteínas reguladoras semelhantes regulam direta ou indiretamente a expressão de um grande número de genes na continuidade da cascata do desenvolvimento.

Genes homeóticos. A perda de genes homeóticos por mutação ou deleção produz o aparecimento de um apêndice normal ou estrutura do corpo em uma posição do corpo inapropriada. Um exemplo importante é o gene *ultrabithorax (Ubx)*. Quando a função *Ubx* é perdida, o primeiro segmento abdominal se desenvolve incorretamente, tendo a estrutura do terceiro segmento torácico. Outras mutações homeóticas conhecidas produzem a formação de um conjunto de asas extras (pág. 846), ou duas pernas na posição da cabeça, onde normalmente se encontram as antenas (Fig. 28-40).

Os genes homeóticos espalham-se por longas regiões do DNA. O gene *ubx*, por exemplo, tem 77.000 pares de bases de comprimento e contém íntrons de até 50.000 pares de bases. A transcrição desse gene dura aproximadamente uma hora.

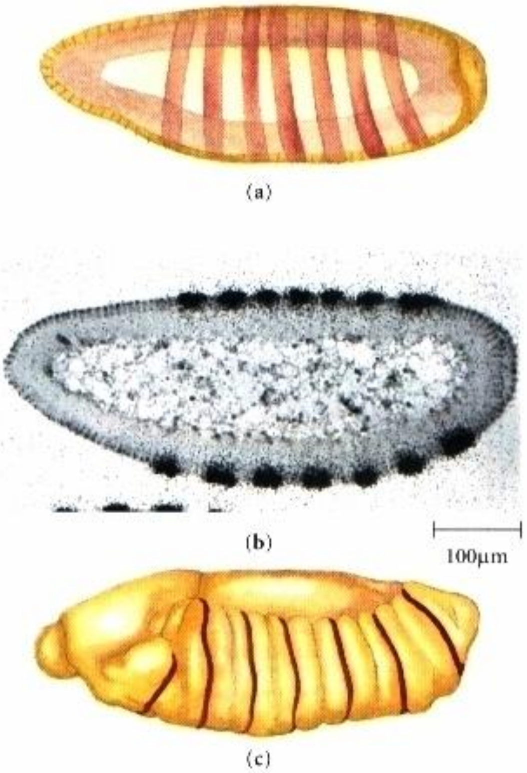


Figura 28-39 – Distribuição do produto do gene *fushi tarazu (ftz)* no início do embrião da *Drosophila*. (**a**) No embrião normal, o produto gênico pode ser detectado em sete bandas em volta da circunferência do embrião (mostrado esquematicamente). (**b**) Estas bandas são vistas como manchas escuras (geradas por uma marcação radioativa) na autoradiografia de um corte seccional, e (**c**) demarcam as margens anteriores dos segmentos no embrião avançado (marcado em vermelho).

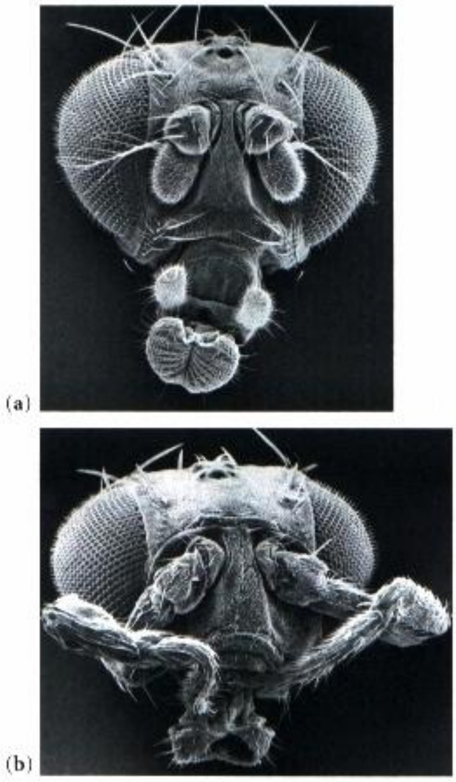


Figura 28-40 – Os efeitos das mutações nos genes homeóticos na *Drosophila*. (**a**) Cabeça normal. (**b**) Mutante homeótica (*antennapaedia*) na qual as antenas são substituídas por pernas. Em outra mutante homeótica, *bitórax*, um segmento se desenvolve incorretamente produzindo um conjunto de asas extra (veja pág. 846).

O atraso que isso impõe na expressão gênica de Ubx acredita-se que seja um mecanismo de tempo envolvido na regulação temporal das etapas subseqüentes do desenvolvimento. A proteína Ubx é um outro ativador transcricional com um homeodomínio (Fig. 28-13).

Muitos dos princípios do desenvolvimento esboçados anteriormente aplicam-se dos nematodos até o homem. Algumas das próprias proteínas reguladoras são conservadas. Por exemplo, os produtos dos genes, contendo a seqüência homeo *HOX* 1.1 no camundongo e na *antennapedia* da mosca das frutas, diferem apenas em um resíduo de aminoácido. É claro que, embora os mecanismos moleculares regulatórios possam ser semelhantes, muitos dos eventos moleculares finais não são conservados (o homem não possui asas ou antenas). A descoberta de determinantes estruturais com funções moleculares identificáveis é a primeira etapa na compreensão dos eventos moleculares que dão suporte ao desenvolvimento. À medida que mais genes e seus produtos gênicos sejam descobertos, o lado bioquímico desse vasto quebra-cabeça será elucidado com um detalhamento cada vez mais rico.

Resumo

A expressão dos genes é regulada por vários processos que afetam as velocidades pelas quais os produtos gênicos são sintetizados e degradados. Muito dessa regulação ocorre no nível da iniciação da transcrição, mediada por proteínas reguladoras que ou reprimem ou ativam a transcrição em promotores específicos. O efeito dos repressores é chamado de regulação negativa; a ativação é a regulação positiva.

As proteínas reguladoras são proteínas de ligação ao DNA que reconhecem seqüências de DNA específicas; a maioria das quais possuem domínios de ligação ao DNA distintos. Dentro desses domínios, motivos estruturais comuns que ligam ao DNA são a hélice-volta-hélice, o dedo de zinco e o homeodomínio. Proteínas reguladoras também contêm domínios para interações proteína-proteína, incluindo o zíper de leucina e a hélice-alça-hélice, envolvidas na dimerização e outros domínios implicados na ativação da transcrição.

Nas bactérias, genes que codificam produtos com funções interdependentes são freqüentemente agrupados numa única unidade de transcrição, chamada de operon, e a transcrição dos genes é geralmente bloqueada pela ligação de uma proteína repressora específica num sítio do DNA chamado de operador. A dissociação do repressor do operador é mediada por uma molécula específica pequena, chamada de indutor. Esses princípios foram primeiro elucidados nos estudos do operon da lactose (*lac*). O repressor Lac dissocia-se do operador *lac* quando o repressor se liga ao seu indutor, a alolactose.

O operon da lactose da *E. coli* também exibe uma regulação positiva pela proteína receptora do cAMP (CRP). Quando [cAMP] for alta (ou seja, quando a [glicose] for baixa), a CRP liga-se a um sítio específico no DNA, estimulando a transcrição do operon *lac* e a produção das enzimas metabolizadoras da lactose. A presença da glicose deprime [cAMP], diminuindo a expressão dos genes *lac* e outros genes e prevenindo o metabolismo de açúcares secundários. Um grupo de operons coordenadamente regulados é referido como um regulon.

No operon da arabinose (*ara*), a proteína AraC age tanto como ativadora quanto como repressora. Alguns repressores, como no operon *ara*, regulam a sua própria síntese (auto-regulação). Algumas proteínas reguladoras no sistema *ara* ligam-se a sítios de DNA distantes muitos pares de bases entre si e interagem pela formação de uma alça de DNA.

Os operons, que produzem as enzimas da síntese do aminoácidos, possuem um circuito regulador chamado de atenuação, que usa um sítio de terminação da transcrição (o atenuador). A formação da estrutura do atenuador no mRNA é modulada por um mecanismo que acopla a transcrição e a tradução enquanto responde a pequenas alterações na concentração dos aminoácidos.

No sistema SOS, genes múltiplos não agrupados, que são reprimidos por um único tipo de proteína repressora, são induzidos simultaneamente quando o DNA lesado desencadeia a proteólise auto-catalítica do repressor facilitada pela proteína RecA. Alguns genes procarióticos são regulados pelos processos da recombinação gênica que transferem os promotores relativamente aos genes que estão sendo regulados. A regulação procariótica pode também ocorrer no nível da tradução. Na síntese das proteínas ribossomais, uma proteína, em cada operon r-proteína, atua como um repressor tradicional. O mRNA é ligado pelo repressor e a tradução, dessa forma, é bloqueada apenas quando a r-proteína estiver em excesso ao rRNA disponível. Esses mecanismos diversos permitem uma resposta celular muito sensível a alterações nas condições ambientais.

As células eucarióticas usam muitos dos mesmos esquemas regulatórios, embora a regulação positiva pareça ser mais comum e a transcrição seja acompanhada por grandes alterações na estrutura da cromatina. Os promotores para a RNA polimerase II tipicamente possuem seqüências TATA e Inr, bem como sítios de ligação múltiplos para os transativadores de ligação ao DNA. Esses sítios, algumas vezes localizados a centenas ou mesmo milhares de pares de bases distantes da seqüência TATA, são chamados de seqüências ativadoras a montante na levedura e intensificadores nos eucariotos superiores. Grandes complexos de proteínas são geralmente requeridos para regular a atividade transcricional. Os efeitos dos transativadores de ligação ao DNA na RNA polimerase II são mediados por complexos protéicos co-ativadores, como o TFIID ou o mediador. As estruturas modulares dos transativadores possuem domínios distintos de ativação e de ligação ao DNA. Outros complexos protéicos, incluindo as histonas acetiltransferases, como GCN5-ADA2-ADA3, e complexo dependentes de ATP, como o SWI/SNF e NURF, remodelam reversivelmente a estrutura da cromatina.

Os hormônios afetam a regulação da expressão gênica em uma de duas maneiras. Os hormônios esteróides ou tireoideanos interagem diretamente com receptores intracelulares que são proteínas reguladoras; a ligação do hormônio possui efeitos positivos ou negativos na transcrição dos genes atingidos pelo hormônio. Os hormônios não esteróides se ligam a receptores da superfície da célula, desencadeando uma via de sinalização que pode levar à fosforilação de uma proteína reguladora, afetando sua atividade.

O desenvolvimento de um organismo multicelular apresenta o desafio regulatório mais complexo. O destino das células, no início do embrião, é determinado pelo estabelecimento de gradientes de proteínas, anterior-posterior e dorso ventral, que atuam como transativadores ou repressores, regulando os genes requeridos para o desenvolvimento de estruturas apropriadas para uma parte específica do organismo. Conjuntos de genes regulatórios operam em sucessão temporal e espacial, transformando certas áreas de uma célula ovo em estruturas predizíveis no organismo adulto.

Leitura Adicional

Geral

Hershey JWB, Mathews MB, & Sonenberg N. (1996) *Translational Control,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Muitas revisões detalhadas cobrem todos os aspectos deste tópico.

Lewin B. (2000) *Genes VII.* Oxford University Press, New York.

A última edição de um texto confiável.

Müller-Hill, B. (1996) *The* lac *Operon: A Short History of a Genetic Paradigm,* Walter de Gruyter, New York.

Um relato detalhado excelente sobre a investigação desse importante sistema.

Neidhardt FC. (ed.) (1996) Escherichia coli *and* Salmonella typhimurium, 2nd edn, Vol. 1: *Cellular and Molecular Biology* (Curtis R, Ingraham JL, Lin ECC, Magasanik B, Low KB, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, & Umbarger HE eds), American Society for Microbiology, Washington, DC.

Uma fonte de referências excelente para revisões de muitos operons bacterianos.

Pabo CO & Sauer RT. (1992) Transcription factors: structural factors and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem:* **61**, 1053-1095.

Schleif R. (1993) *Genetics and Molecular Biology*, 2nd edn, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

Fornece uma excelente narrativa para as bases experimentais dos principais conceitos da regulação gênica nos procariotos.

Regulação da expressão gênica nos procariotos

Blumenthal RM, Borst DW, & Matthews RG. (1996) Experimental analysis of global gene regulation in *Escherichia coli*. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **55**, 1-86.

Condon C, Squires C, & Squires CL. (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **59**, 623-645.

Gourse RL, Gaal T, Bartlett MS, Appleman JA, & Ross W. (1996) rRNA transcription and growth rate–dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 645-677.

Jacob F & Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356.

O modelo do operon e o conceito do RNA mensageiro foram propostos neste trabalho histórico.

Johnson RC. (1991) Mecanism of site-specific DNA inversion in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**, 404-411.

Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S, & Adhya S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP nd its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749-795.

Landick R & Roberts JW. (1996) The shrewd grasp of RNA polymerase. *Science* **273**, 202-203.

Yanofsky C, Konan KV, & Sarsero JP. (1996) Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria. *Biochimie* **78**, 1017-1024.

Regulação da expressão gênica nos eucariotos

Bashirullah A, Cooperstock RL, & Lipshitz HD. (1998) RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 335-394.

Beardsley T. (1991) Smart genes. *Sci. Am.* **265** (August), 86-95.

Uma boa revisão da regulação gênica durante o desenvolvimento.

DeRobertis EM, Oliver G, & Wright CVE. (1990) Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Sci. Am.* **263** (July), 46-52.

Edmondson DG & Roth SY. (1996) Chromatin and transcription. *FASEB J.* **10**, 1173-1182

Gingras A-C, Raught B, & Sonenberg N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem* **68**, 913-963.

Gray NK & Wieckens M. (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 399-458.

Johnson AD. (1995) The price of repression. *Cell* **81**, 655-658.

Kornberg RD. (1996) RNA polymerase II transcription control. *Trends Biochem. Sci* **21**, 325-326.

Artigo líder em um volume dedicado à RNA polimerase II e sua regulação.

Mannervick M, Nibu Y, Zhang H, & Levine M. (1999) Transcriptional coregulators in development. *Science* **284**, 606-609.

McKnight SL. (1991) Molecular zippers in gene regulation. *Sci. Am.* **264** (April), 54-64.

Uma boa descrição dos zíperes de leucina.

Melton DA. (1991) Pattern formation during animal development. *Science* **252**, 234-241.

Muller WA. (1997) *Developmental Biology*, Springer, New York.

Um bom texto elementar.

Pugh BF. (1996) Mechanisms of transcription complex assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 303-311.

Reece R & Platt A. (1997) Signaling activation and repression of RNA polymerase II transcription in yeast. *Bioessays* **19**, 1001-1010.

Rivera-Pomar R & Jackle H. (1996) From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet.* **12**, 478-483.

Steger DJ & Workman JL. (1996) Remodeling chromatin structures for transcription: what hapens to the histones? *Bioessays* **18**, 875-884.

Struhl K. (1995) Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 651-674.

Struhl K. (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**, 1-4.

Thummel CS. (1992) Mechanisms of transcriptional timing in *Drosophila*. *Science* **255**, 39-40.

Travers A. (1999) An engine for nucleosome remodeling. *Cell* **96**, 311-314.

Wade PA, Pruss D, & Wolffe A. (1997) Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci.* **22**, 128-132.

Wickens M, Kimble J, & Strickland S. (1996) Translational control of developmental decisions. In *Translational Control* (Hershey JWB, Mathews MB, & Sonenberg N, eds), pp. 411-450, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Zlatanova J. (1990) Histone H1 and the regulation of transcription of eukaryotic genes. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 273-276.

Problemas

1. **Efeito da estabilidade do mRNA e da proteína na regulação.** Células da *E. coli* estão crescendo num meio com glicose como única fonte de carbono. O triptofano é adicionado abruptamente. As células continuam a crescer e dividem-se a cada 30 minutos. Descreva (qualitativamente) como a quantidade da atividade da triptofano sintetase nas células muda nas seguintes condições:

(a) O mRNA do *trp* é estável (degradado lentamente depois de muitas horas).

(b) O mRNA do *trp* é degradado rapidamente, mas a triptofano sintetase é estável.

(c) O mRNA do *trp* e a triptofano sintetase são ambos degradados mais rapidamente do que o normal.

2. **Regulação negativa.** Descreva os prováveis efeitos na expressão gênica no operon *lac* de mutações no:

(a) operador *lac* que tenha deletado a maior parte de O_1

(b) gene *lacI* que tenha inativado o repressor

(c) promotor que tenha eliminado a região ao redor da posição −10.

3. **A especificidade da ligação ao DNA pelas proteínas reguladoras.** Uma proteína repressora procariótica típica discrimina entre o seu sítio específico de ligação no DNA (operador) e o DNA não-específico por um fator de 10^4 a 10^6. Cerca de 10 moléculas do repressor por célula são suficientes para garantir um alto nível de repressão. Assuma que um repressor muito semelhante exista numa

célula humana, com uma especificidade semelhante para o seu sítio de ligação. Quantas cópias do repressor seriam necessárias por célula para elicitar um nível de repressão semelhante àquela vista na célula procariótica? (Indicação: o genoma da *E. coli* contém cerca de 4,7 milhões de pares de bases; o genoma humano haplóide contém cerca de 2,4 bilhões de pares de bases).

4. Concentração do repressor na *E. coli*. A constante de dissociação para um complexo repressor-operador particular é muito pequena, cerca de 10^{-13}M. Uma célula da *E. coli* (volume 2×10^{-12}mL) contém 10 cópias do repressor. Calcule a concentração celular da proteína repressora. Como esse valor se compara à constante de dissociação para o complexo repressor-operador? Qual é o significado desse valor?

5. Repressão catabólica. As células da *E. coli* estão crescendo num meio contendo lactose, mas não glicose. Indique se cada uma das seguintes alterações ou condições aumentariam, diminuiriam ou não alterariam a expressão do operon *lac*. Seria útil desenhar um modelo descrevendo o que aconteceria em cada situação.

(a) Adição de uma alta concentração de glicose.

(b) Uma mutação que previna a dissociação do repressor Lac do operador.

(c) Uma mutação que inative completamente a β-galactosidase.

(d) Uma mutação que inativa completamente a galactosídeo permease.

(e) Uma mutação que previna a ligação da CRP ao seu sítio de ligação próximo ao promotor *lac*.

6. Atenuação da transcrição. Como seria afetada a transcrição do operon do *trp* da *E. coli* pelas seguintes manipulações da região líder do mRNA do *trp*?

(a) Aumentando a distância (número de bases) entre o gene do peptídeo líder e a seqüência 2.

(b) Aumentando a distância entre as seqüências 2 e 3.

(c) Removendo a seqüência 4.

(d) Alterando os dois códons de Trp no gene do peptídeo líder para códons His.

(e) Eliminando o sítio de ligação ao ribossomo para o gene que codifica o peptídeo líder.

(f) Alterando vários nucleotídeos, na seqüência 3, de forma que ela pudesse fazer pareamento de base com a seqüência 4, mas não com a seqüência 2.

7. Repressores e repressão. Como seria a resposta SOS na *E. coli* afetada por uma mutação no gene *lex*A que previna a clivagem autocatalítica da proteína LexA?

8. Regulação pela recombinação. No sistema de variação da fase da *Salmonella*, o que aconteceria para a célula se a recombinase Hin se tornasse mais ativa e promovesse a recombinação (inversão do DNA) várias vezes em cada geração celular?

9. Iniciação da transcrição nos eucariotos. Uma nova atividade RNA polimerásica é descoberta nos extratos crus de células derivadas de um fungo exótico. A RNA polimerase inicia a transcrição apenas de um promotor altamente especializado. À medida que a polimerase é purificada, sua atividade declina e a enzima purificada é completamente inativa, a menos que o extrato cru seja adicionado à mistura de reação. Sugira uma explicação para essas observações.

10. Domínios funcionais nas proteínas reguladoras. Um bioquímico substitui o domínio de ligação ao DNA da proteína Gal4 da levedura com o domínio de ligação ao DNA do repressor Lac e encontra que a proteína construída não regula mais a transcrição dos genes *GAL* na levedura. Desenhe um diagrama dos domínios funcionais diferentes que você espera encontrar na proteína Gal4 e na proteína engenhariada. Por que a proteína engenhariada não mais regularia a transcrição dos genes *GAL*? O que poderia ser feito no sítio de ligação ao DNA reconhecido por essa proteína quimérica para fazê-la funcional em ativar a transcrição dos genes *GAL*?

11. Mecanismo hereditários no desenvolvimento. Um ovo da *Drosophila* que seja *bcd*$^-$/*bcd*$^-$ pode se desenvolver normalmente, mas um adulto não será capaz de produzir descendência viável. Explique.

Bioquímica na Internet

12. A proteína de ligação à TATA e a seqüência TATA. Para examinar as interações entre os fatores de transcrição e o DNA, vá ao Protein Data Bank e chame o arquivo PDB 1TGH. Este arquivo modela as interações entre uma proteína de ligação à TATA humana e um segmento de DNA de dupla fita. Use o Noncovalent Bond Finder encontrado na página Chime Resources Web para examinar os papéis das pontes de hidrogênio e das interações hidrofóbicas envolvidas na ligação desse fator de transcrição para a seqüência TATA no DNA. (Para a URLs corrente desses sítios da Web e para outras instruções de como usar o Noncovalent Bond Finger, vá ao http://www.worthpublisher.com/lehninger.)

Dentro do programa Noncovalent Bond Finder, carregue o arquivo PDB e exiba a proteína no modo Spacefill e o DNA no Wireframe. Vá até o site da Web do Lehninger para instruções mais detalhadas, a fim de responder às seguintes questões:

(a) Que pares de bases no DNA formam pontes de hidrogênio com a proteína? Quais deles contribuem para o reconhecimento específico da seqüência TATA por essa proteína? (O comprimento das pontes de hidrogênio oscila entre 2,5 a 3,3Å entre o doador e o aceptor de hidrogênio).

(b) Que resíduos de aminoácidos na proteína interagem com esses pares de bases? Em que bases você fez esta determinação? Estas observações concordam com a informação presente no texto?

(c) Qual é a seqüência do DNA neste modelo e que porções da seqüência são reconhecidas pela proteína de ligação à TATA?

(d) Pode você identificar quaisquer interações hidrofóbicas nesse complexo? (Interações hidrofóbicas usualmente ocorrem com distâncias interatômicas de 3,3 a 4,0Å.)

CAPÍTULO 29

Tecnologia do DNA Recombinante

Paul Berg

Stanley N. Cohen

Herbert Boyer

Este capítulo final descreve uma tecnologia que é agora fundamental para o avanço das modernas ciências biológicas, definindo as fronteiras bioquímicas presentes e futuras, ilustrando muitos princípios importantes da bioquímica. A elucidação das leis que governam a catálise enzimática, a estrutura macromolecular, o metabolismo celular e as vias da informação permitem ao pesquisador estar dirigindo para os mais complexos processos bioquímicos. A divisão celular, a imunidade, a embriogênese, a visão, o gosto, a oncogênese, a cognição, todos são orquestrados numa elaborada sinfonia de interações moleculares e macromoleculares, as quais estão sendo entendidas com aumentada clareza. As reais implicações da jornada bioquímica, começadas no século XIX, aumentaram com intensa força para entender e alterar os sistemas vivos.

Para entender um processo biológico complexo, um bioquímico isola e estuda os componentes individuais *in vitro*, a seguir junta as partes para obter um quadro coerente do processo total. Talvez a fonte mais fértil de idéias moleculares esteja no próprio armazenamento da informação celular, no seu DNA. O mero tamanho dos cromossomos, entretanto, apresenta-se a nós como um enorme desafio. Como encontrar e estudar um gene particular entre outros 100.000 genes espalhados entre bilhões de pares de bases do genoma humano? As soluções começaram a aparecer durante os anos 1970.

Décadas de avanços e milhares de cientistas trabalhando em genética, bioquímica, biologia celular e físico-química chegaram juntos aos laboratórios de Paul Berg, Herbert Boyer e Stanley Cohen, produzindo técnicas para localizar, isolar, preparar e estudar pequenos segmentos de DNA, derivados de cromossomos muito maiores. Técnicas para **clonagem do DNA** abriram oportunidades não imagináveis para identificar e estudar os genes envolvidos em quase todos os processos biológicos conhecidos. Esses novos métodos estão transformando a pesquisa básica, a agricultura, a medicina, a ecologia, a medicina legal e muitos outros campos, enquanto, ao mesmo tempo, apresentam à sociedade escolhas desconcertantes e sérios dilemas éticos.

As primeiras duas partes deste capítulo esboçam esses princípios bioquímicos fundamentais que suportam essa revolucionária tecnologia, recorrendo ao nosso entendimento do material discutido nos cinco capítulos anteriores. A seleção genética e o rastreamento ("screening") serão, então, considerados no final da seção deste capítulo que ilustra a variação das aplicações e o potencial dessa tecnologia.

Clonagem do DNA: O Básico

Clonar significa fazer cópias idênticas. Esse termo, originalmente aplicado ao procedimento de isolar uma célula, permite, então, sua reprodução, criando a população de células idênticas para estudo. A clonagem do DNA envolve a separação de um gene específico ou segmento de DNA do seu cromossomo maior, a sua ligação a uma molécula de DNA transportadora pequena e depois a replicação desse DNA modificado, milhares ou mesmo milhões de vezes, por meio de um aumento no número de células e a criação de múltiplas cópias em cada célula do DNA clonado. O resultado é uma amplificação seletiva de um gene ou segmento de DNA particular. A clonagem de DNA a partir de qualquer organismo baseia-se em cinco procedimentos gerais:

1. Cortar o DNA em localizações precisas. Endonucleases de seqüências específicas (endonucleases de restrição) fornecem as tesouras moleculares necessárias.
2. Unir dois fragmentos de DNA covalentemente. A DNA ligase faz isso.
3. A seleção de uma pequena molécula de DNA capaz de autoreplicação. Segmentos de DNA a serem clonados podem se unir a DNAs plasmidiais ou virais (**vetores de clonagem**; um vetor é um agente de entrega). Essas moléculas de DNA compostas, contendo segmentos covalentemente ligados, derivados de duas ou mais fontes, são chamadas de **DNAs recombinantes**.
4. Transferir o DNA recombinante do tubo de ensaio para uma célula hospedeira, que pode fornecer a maquinaria enzimática para a replicação do DNA.
5. Selecionar ou identificar aquelas células hospedeiras que contenham o DNA recombinante.

Os métodos usados para realizar essas tarefas e outras relacionadas são coletivamente referidos como **tecnologia do DNA recombinante**, ou, mais informalmente, como **engenharia genética**.

Nesta discussão inicial, concentraremo-nos na clonagem do DNA na bactéria *E. coli*, que foi o primeiro organismo usado para o trabalho do DNA recombinante e ainda é a célula hospedeira mais comum. A *E. coli* possui muitas vantagens: o seu metabolismo do DNA (e muitos outros processos bioquímicos) é bem entendido; muitos vetores de clonagem que ocorrem naturalmente, como os bacteriófagos e os plasmídios associados com a *E. coli*, são bem caracterizados; e técnicas efetivas estão disponíveis para transferir o DNA de uma célula bacteriana para outra. A clonagem do DNA em outros organismos será tratada mais adiante neste capítulo.

As endonucleases de restrição e a DNA ligase produzem o DNA recombinante

Particularmente importante para a tecnologia do DNA recombinante é um conjunto de enzimas tornado disponível graças a décadas de pesquisa no metabolismo dos ácidos nucléicos (Tabela 29-1). Duas classes de enzimas encontram-se no centro da abordagem geral para gerar e propagar uma molécula de DNA recombinante (Fig. 29-1). Primeira, as **endonucleases de restrição do tipo II** clivam o DNA em seqüências específicas para gerar um conjunto de fragmentos menores. Segunda, o fragmento de DNA a ser clonado pode ser isolado e unido a um vetor de clonagem apropriado, usando a **DNA ligase** para selar as moléculas de DNA. O vetor recombinante é, então, introduzido numa célula hospedeira que o amplifica, à medida que a célula realiza muitas gerações de divisões celulares.

Endonucleases de restrição são encontradas num largo espectro de espécies bacterianas. Werner Arber descobriu que sua função biológica é reconhecer e clivar o DNA estranho (por exemplo, o DNA de um vírus infectante); tal DNA, diz-se, deve ser *restrito*. No DNA da célula hospedeira, a seqüência reconhecida pela endonuclease de restrição é protegida da clivagem pela metilação do DNA, catalisada por uma DNA metilase específica. A endonuclease de restrição e a sua metilase correspondente numa bactéria são algumas vezes referidas como um **sistema de restrição-modificação.**

Há três tipos de endonucleases de restrição, designados I, II e III. Os tipos I e III são geralmente complexos grandes de subunidades múltiplas, contendo tanto as atividades de endonuclease como as de metilase. A endonuclease de restrição do tipo I cliva o DNA em locais aleatórios que podem estar 1.000 pares de bases ou mais distantes da seqüência de reconhecimento. Enzimas tipo III clivam o DNA cerca de 25 pares de bases distantes da seqüência de reconhecimento. Ambos os tipos de enzimas movem-se ao longo do DNA numa reação que requer a energia

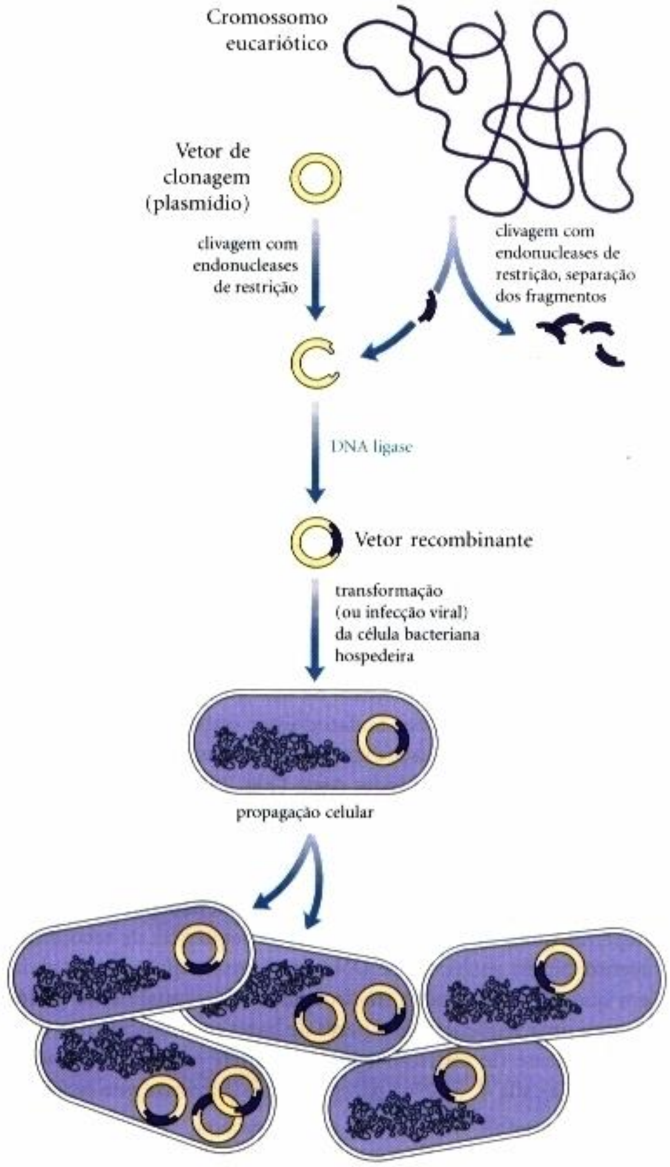

Cromossomo eucariótico
Vetor de clonagem (plasmídio)
clivagem com endonucleases de restrição
clivagem com endonucleases de restrição, separação dos fragmentos
DNA ligase
Vetor recombinante
transformação (ou infecção viral) da célula bacteriana hospedeira
propagação celular

Figura 29-1 – Ilustração esquemática da clonagem do DNA. Um fragmento de DNA de interesse do pesquisador é obtido pela clivagem de um cromossomo eucariótico com uma endonuclease de restrição. Depois de isolar e ligar o fragmento num vetor de clonagem que também tenha sido clivado com a endonuclease de restrição, o DNA recombinante resultante é introduzido numa célula hospedeira onde ele possa ser propagado (clonado). Note que o tamanho do cromossomo da *E. coli* relativamente a um vetor de clonagem típico, como um plasmídio, é muito menor que o desenhado aqui.

Tabela 29-1 – Algumas das enzimas usadas na tecnologia do DNA recombinante

Enzima(s)	Função
Endonucleases de restrição do tipo II	Clivar o DNA em seqüências de bases específicas
DNA ligase	Unir duas moléculas ou fragmentos de DNA
DNA polimerase I (*E. coli*)	Preencher vazios nos dúplex pela adição sucessiva de nucleotídeos nas extremidades 3′
Transcriptase reversa	Sintetizar uma cópia de DNA de uma molécula de RNA
Polinucleotídeo quinase	Adicionar um fosfato à extremidade 5′-OH de um polinucleotídeo para marcá-lo ou permitir ligação
Terminal transferase	Adicionar caudas homopoliméricas às extremidades 3′-OH de um dúplex linear
Exonuclease III	Remoção de resíduos de nucleotídeos a partir das extremidades 3′ de uma fita de DNA
Exonuclease do bacteriófago λ	Remoção de nucleotídeos, a partir das extremidades 5′ de um dúplex, para expor extremidades 3′ de fita simples
Fosfatase alcalina	Remoção de fosfatos terminais a partir das extremidades 5′ ou 3′ (ou ambas)

do ATP. As enzimas de restrição do tipo II, primeiramente isoladas por Hamilton Smith, são mais simples, não requerem ATP e clivam o DNA dentro da própria seqüência de reconhecimento. A extraordinária utilidade dessas enzimas foi demonstrada por Daniel Nathans, que primeiro as usou para desenvolver novos métodos para mapeamento e análise de genes e genomas.

Milhares de endonucleases de restrição foram descobertas em diferentes espécies bacterianas. Mais de 100 seqüências específicas diferentes são reconhecidas por uma ou mais dessas enzimas. As seqüências de reconhecimento são usualmente de quatro a seis pares de bases em comprimento e palindrômicas (veja Fig. 10-20). Umas poucas seqüências de reconhecimento, por algumas endonucleases de restrição do tipo II, são apresentadas na Tabela 29-2. Em alguns casos, a interação entre uma endonuclease de restrição e sua seqüência-alvo foi elucidada com um detalhamento molecular refinado. O complexo, compreendendo a endonuclease de restrição do tipo II, a *Eco*RV, e sua seqüência-alvo, é ilustrada na Figura 29-2.

Algumas endonucleases de restrição realizam cortes contundentes sobre as duas fitas do DNA, deixando dois a quatro nucleotídeos de uma fita não-pareado em cada extremidade resultante. Essas extremidades são freqüentemente chamadas de **extremidades coesivas** (Fig. 29-3a) porque elas podem base-parear com outra ou com extremidades coesivas de um outro fragmento de DNA. Outras endonucleases de restrição clivam ambas as fitas do DNA nas ligações fosfatodiéster opostas, não deixando bases despareadas em cada extremidade; essas são freqüentemente chamadas de **extremidades cegas** (Fig. 29-3b).

O tamanho médio dos fragmentos de DNA produzidos pela clivagem do DNA genômico com uma endonuclease de restrição depende da freqüência com que um sítio de restrição particular ocorre numa longa molécula de DNA; isso, por outro lado, depende intensamente do tamanho da seqüência de reconhecimento. Numa molécula de DNA com uma seqüência aleatória, em que todos os quatro nucleotídeos estão igualmente abundantes, uma seqüência de 6 pares de bases reconhecida por uma endonuclease de restrição como a *Bam*HI ocorrerá em média uma vez a cada 4^6 (4.096) pares de bases. Enzimas que reconhe-

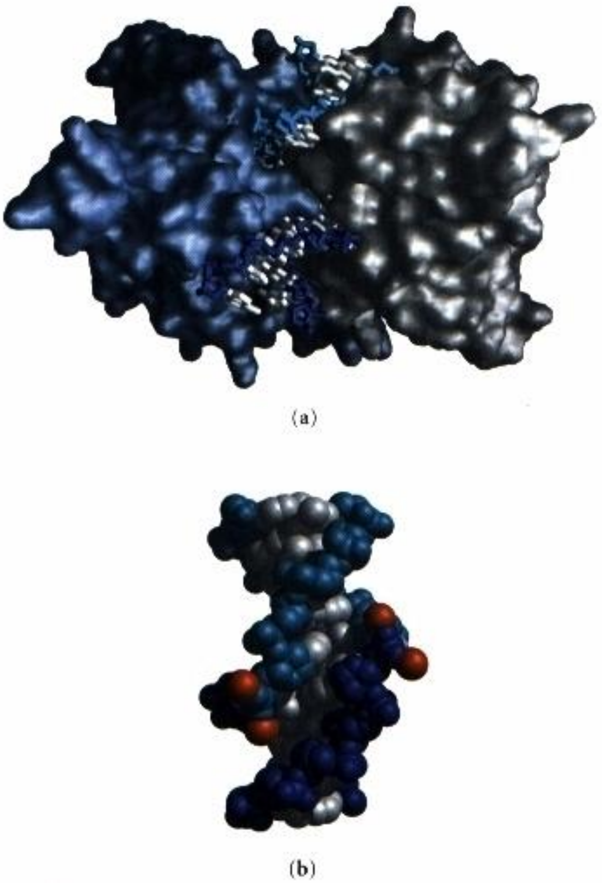
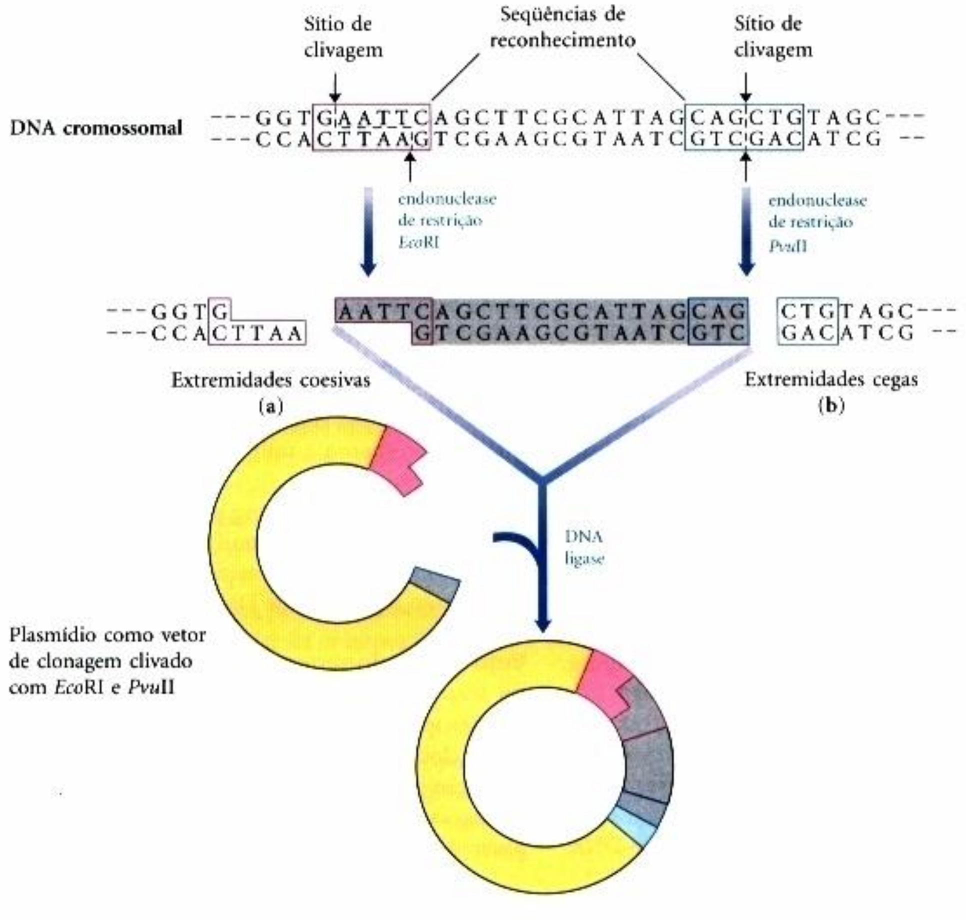


Figura 29-2 – A interação da endonuclease de restrição *Eco*RV com sua seqüência-alvo. (**a**) A enzima dimérica (com suas duas subunidades em cinza e azul-brilhante) é mostrada ligada aos produtos da clivagem do DNA na seqüência reconhecida pela endonuclease *Eco*RV. O esqueleto do DNA é mostrado em duas tonalidades de azul para distinguir os segmentos separados pela clivagem. (**b**) Nesta vista, a proteína foi removida e o DNA girado 180°. Os pontos de clivagem estão contundentes sobre as duas fitas do DNA; sendo assim, a enzima produz extremidades cegas. A ligação de íons magnésio, mostrada em laranja, desempenha uma função na catálise da reação de clivagem.

Tabela 29-2 – Seqüências de reconhecimento para algumas endonucleases de restrição do tipo II

*Bam*HI	↓ (5′) G G A T $\overset{*}{\mathrm{C}}$ C (3′) C C T A G G * ↑	*Hin*dIII	(5′) A A G C T T (3′) T T C G A A ↑
*Cla*I	↓ (5′) A T C G $\overset{*}{\mathrm{A}}$ T (3′) T A G C T A * ↑	*Not*I	↓ (5′) G C G G C C G C (3′) C G C C G G C G ↑
*Eco*RI	↓ (5′) G A $\overset{*}{\mathrm{A}}$ T T C (3′) C T T A A G * ↑	*Pst*I	↓ (5′) C T G $\overset{*}{\mathrm{C}}$ A G (3′) G A C G T C ↑*
*Eco*RV	↓ (5′) G A T A T C (3′) C T A T A G ↑	*Pvu*II	↓ (5′) C A G C T G (3′) G T C G A C ↑
*Hae*III	↓ (5′) G G $\overset{*}{\mathrm{C}}$ C (3′) C C G G *↑	*Tth*111I	↓ (5′) G A C N N N G T C (3′) C T G N N N C A G ↑
	↓		

As setas indicam as ligações fosfatodiésteres clivadas pelas endonucleases de restrição. Os asteriscos indicam as bases que são metiladas pelas metilases correspondentes (quando conhecidas). N indica qualquer base. Observe que o nome de cada enzima consiste em uma abreviação de três letras da espécie bacteriana onde a enzima foi isolada (exemplo, *Bam* para *Bacillus amyloliquefaciens*, *Eco* para *Escherichia coli*). Os números romanos incluídos nos nomes das enzimas (por exemplo, *Bam*HI) distinguem endonucleases de restrições diferentes isoladas das mesmas espécies bacterianas, em vez do tipo de enzima de restrição.


Sítio de clivagem
Seqüências de reconhecimento
Sítio de clivagem
DNA cromossomal
---GGTGAATTCAGCTTCGCATTAGCAGCTGTAGC---
---CCACTTAAGTCGAAGCGTAATCGTCGACATCG --
endonuclease de restrição EcoRI
endonuclease de restrição PvuII
---GGTG
---CCACTTAA
AATTCAGCTTCGCATTAGCAG
GTCGAAGCGTAATCGTC
CTGTAGC---
GACATCG --
Extremidades coesivas
(a)
Extremidades cegas
(b)
DNA ligase
Plasmídio como vetor de clonagem clivado com EcoRI e PvuII

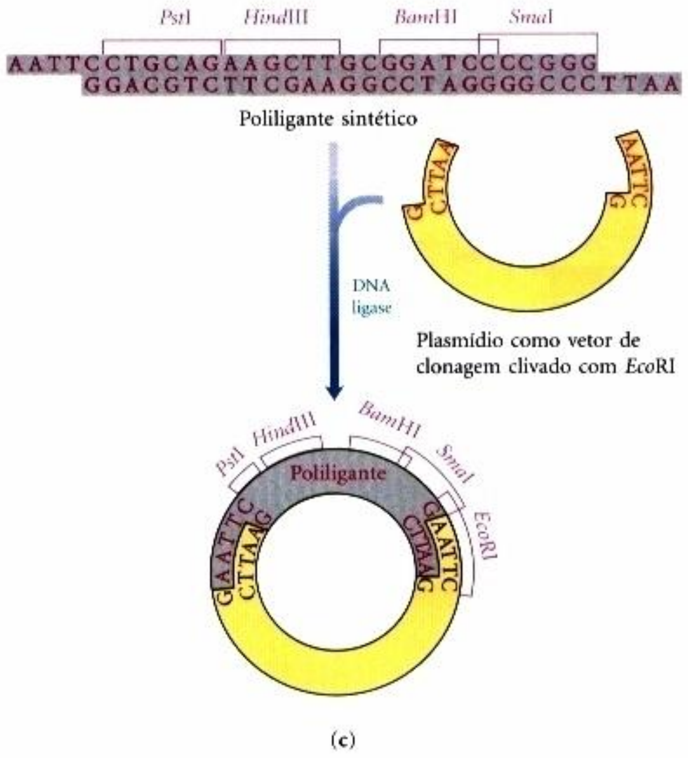

PstI
HindIII
BamHI
SmaI
AATTCCTGCAGAAGCTTGCGGATCCCCGGG
GGACGTCTTCGAAGGCCTAGGGGCCCTTAA
Polilgante sintético
CTTAA
G
AATTC
G
DNA ligase
Plasmídio como vetor de clonagem clivado com EcoRI
PstI
HindIII
BamHI
SmaI
EcoRI
Poliligante
GAATTC
CTTAA
GAATTC
CTTAAG
(c)

Figura 29-3 – Clivagem de moléculas de DNA em fragmentos reproduzíveis pelas endonucleases de restrição. As enzimas de restrição reconhecem e clivam apenas seqüências específicas, deixando ou (**a**) extremidades coesivas (com fitas simples projetadas) ou (**b**) extremidades cegas. Os fragmentos podem ser ligados a outros DNAs tais como o vetor de clonagem (plasmídio) clivado. Essa reação é facilitada pelo anelamento das extremidades coesivas complementares. Os fragmentos de DNA com extremidades cegas são ligados com uma eficiência mais baixa do que com extremidades complementares coesivas e os fragmentos de DNA com diferentes extremidades coesivas (não complementares) geralmente não são ligados. (**c**) Um fragmento de DNA sintético com seqüências de reconhecimento para várias endonucleases pode ser inserido em um plasmídio que tenha sido clivado com a endonuclease de restrição. O inserto é chamado de ligante; um inserto com múltiplos sítios de restrição é chamado de poliligante.

cem uma seqüência de 4 pares de bases produzirão fragmentos de DNA menores; uma seqüência de reconhecimento desse tamanho espera-se que ocorra em média uma vez a cada 4^4 (256) pares de bases. Essas seqüências de reconhecimento particulares tendem a ocorrer menos freqüentemente pelo fato de as seqüências nucleotídicas no DNA não serem aleatórias e os quatro nucleotídeos não serem igualmente abundantes. O tamanho médio dos fragmentos produzidos pela clivagem de um DNA longo pela endonuclease de restrição pode ser aumentado, simplesmente não se permitindo que a reação se complete. Tal reação incompleta é freqüentemente chamada de clivagem parcial.

Assim que uma molécula de DNA for clivada em fragmentos, um fragmento particular de tamanho conhecido pode ser separado dos outros por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida ou HPLC (veja pág. 103). Pelo fato de a clivagem de um genoma de mamífero típico por uma endonuclease de restrição poder produzir várias centenas de milhares de fragmentos diferentes, o isolamento de um fragmento particular de DNA por eletroforese ou HPLC é freqüentemente praticável. Uma etapa intermediária na clonagem de um gene específico ou segmento de DNA de interesse é a construção de uma biblioteca de DNA (descrita posteriormente neste capítulo).

Quando o fragmento-alvo de DNA for isolado, ele se unirá a um vetor de clonagem, usando a DNA ligase (veja Fig. 25-16). O pareamento de bases de extremidades coesivas complementares facilita muito a reação de ligação (Fig. 29-3a). Um fragmento gerado pela *Eco*RI geralmente não se unirá a um fragmento gerado pela *Bam*HI. Extremidades cegas podem também se ligar, embora menos eficientemente. Novas seqüências de DNA podem ser criadas pela inserção de fragmentos de DNA sintéticos (denominados **ligantes**) entre as extremidades que estão sendo ligadas (Fig. 29-3c). Fragmentos de DNA com múltiplas seqüências de reconhecimento para endonucleases (freqüentemente utilizados mais adiante em pontos em que o DNA adicional pode ser inserido pela clivagem e ligação) são chamados de **poliligantes**.

A eficiência das extremidades coesivas em, seletivamente, unir dois fragmentos de DNA era aparente nos primórdios do DNA recombinante. Antes que as endonucleases de restrição fossem largamente disponíveis, alguns pesquisadores descobriram que as extremidades coesivas poderiam ser geradas pela ação combinada da exonuclease do bacteriófago λ e a terminal transferase (Tabela 29-1). Os fragmentos a serem unidos recebiam caudas homopoliméricas complementares (Fig. 29-4). Esse método foi usado por Peter Lobban e Dale Kaiser, em 1971, no primeiro experimento a unir fragmentos de DNA que ocorriam naturalmente. Métodos semelhantes foram usados logo depois no laboratório de Paul Berg para unir segmentos de DNA do vírus do símio 40 (SV40) ao DNA derivado do bacteriófago λ, criando, dessa forma, a primeira molécula de DNA recombinante, envolvendo segmentos de DNA de espécies diferentes.

Vetores de clonagem permitem a amplificação de segmentos de DNA inseridos

Os princípios que governam a maneira do DNA recombinante em forma clonável para a célula hospedeira e a sua subseqüente amplificação podem ser vistos considerando três vetores populares de clonagem, comumente utilizados em experimentos com *E. coli* — plasmídios, bacteriófago e cromossomos artificiais de bactéria.

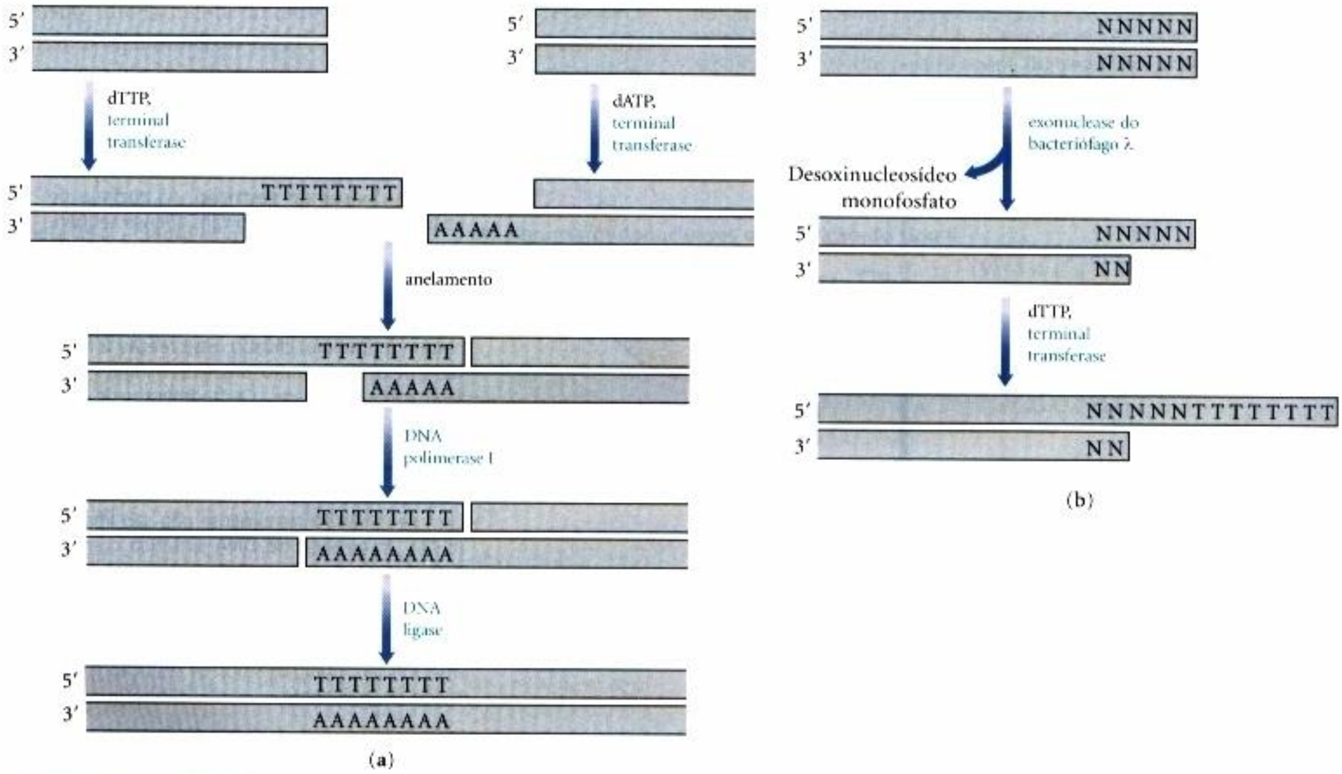


Figura 29-4 – A terminal transferase pode ser usada para produzir extremidades coesivas para unir dois fragmentos de DNA. (**a**) Caudas homopoliméricas complementares são adicionadas às extremidades de dois fragmentos a serem unidos, formando extremidades coesivas. Depois de anelados, os espaços vazios são preenchidos e os furos selados pela ação seqüencial da DNA polimerase I e da DNA ligase. (**b**) O substrato ótimo para a terminal transferase é a 3'-OH na extremidade de uma fita simples de, pelo menos, três nucleotídeos de comprimento. Se as extremidades do DNA dúplex possuírem uma fita simples projetada na extremidade 5' ou nas extremidades cegas, a exonuclease λ (que degrada fitas de DNA na direção 5'→3') poderá ser usada para criar um bom substrato para a terminal transferase. N denota qualquer base.

Plasmídios. Os plasmídios (veja Fig. 24-6) são moléculas de DNA circulares que se replicam separadamente do cromossomo hospedeiro. Plasmídios bacterianos que ocorrem naturalmente variam de tamanho de 5.000 a 400.000 pares de bases. Os plasmídios podem ser introduzidos nas células bacterianas por um processo chamado de **transformação.** Para conseguir que as células recebam o DNA, as células e o DNA são incubados juntos, a 0°C, numa solução de cloreto de cálcio, e depois submetidos a um choque térmico, transferindo as células rapidamente para temperaturas entre 37 e 43°C. Por razões não inteiramente conhecidas, as células assim tratadas tornam-se "competentes" para receber o DNA. Alternativamente, as células incubadas com o DNA do plasmídio podem ser submetidas a um pulso de alta voltagem. Essa metodologia, denominada **eletroporação,** induz a membrana celular a se tornar permeável transitoriamente a grandes moléculas.

Apesar da metodologia utilizada, poucas células recebem o DNA plasmidial e um método é necessário para selecionar aquelas que o receberam. A estratégia usual é assegurar que o plasmídio contenha um gene de que a célula hospedeira necessite para crescer em condições específicas, tal gene confere resistência a um antibiótico. Somente as células que foram transformadas pelo plasmídio recombinante podem crescer na presença do antibiótico, tornando qualquer célula que contenha o plasmídio "selecionável" sob essas condições. Tal gene é, algumas vezes, chamado de marcador seletivo.

Muitos vetores plasmidiais diferentes, apropriados para a clonagem, foram desenvolvidos pela modificação de plasmídios de ocorrência natural. O plasmídio pBR322 da *E. coli* oferece um bom exemplo das características úteis em vetor de clonagem (Fig. 29-5):

1. Uma origem de replicação é requerida para propagar o plasmídio e ajudar a mantê-lo num nível de 10 a 20 cópias por célula.
2. Dois genes que confiram resistência a antibióticos diferentes permitem a seleção das células que contenham o plasmídio ou a versão recombinante dele (Fig. 29-6).

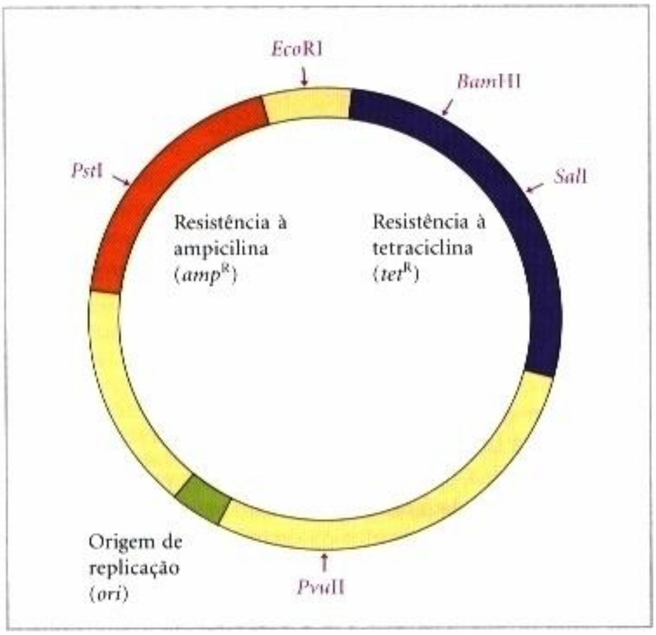

*Eco*RI
*Bam*HI
*Pst*I
*Sal*I
Resistência à ampicilina (amp^R)
Resistência à tetraciclina (tet^R)
Origem de replicação (*ori*)
*Pvu*II

Figura 29-5 – A construção do plasmídio pBR322 da *E. coli*. Observe a localização de alguns sítios de restrição importantes para *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I e *Pvu*II; genes de resistência à ampicilina e à tetraciclina e a origem da replicação (*ori*). Construído em 1977, foi um dos plasmídios iniciais planejados expressamente para clonagem em *E. coli*.

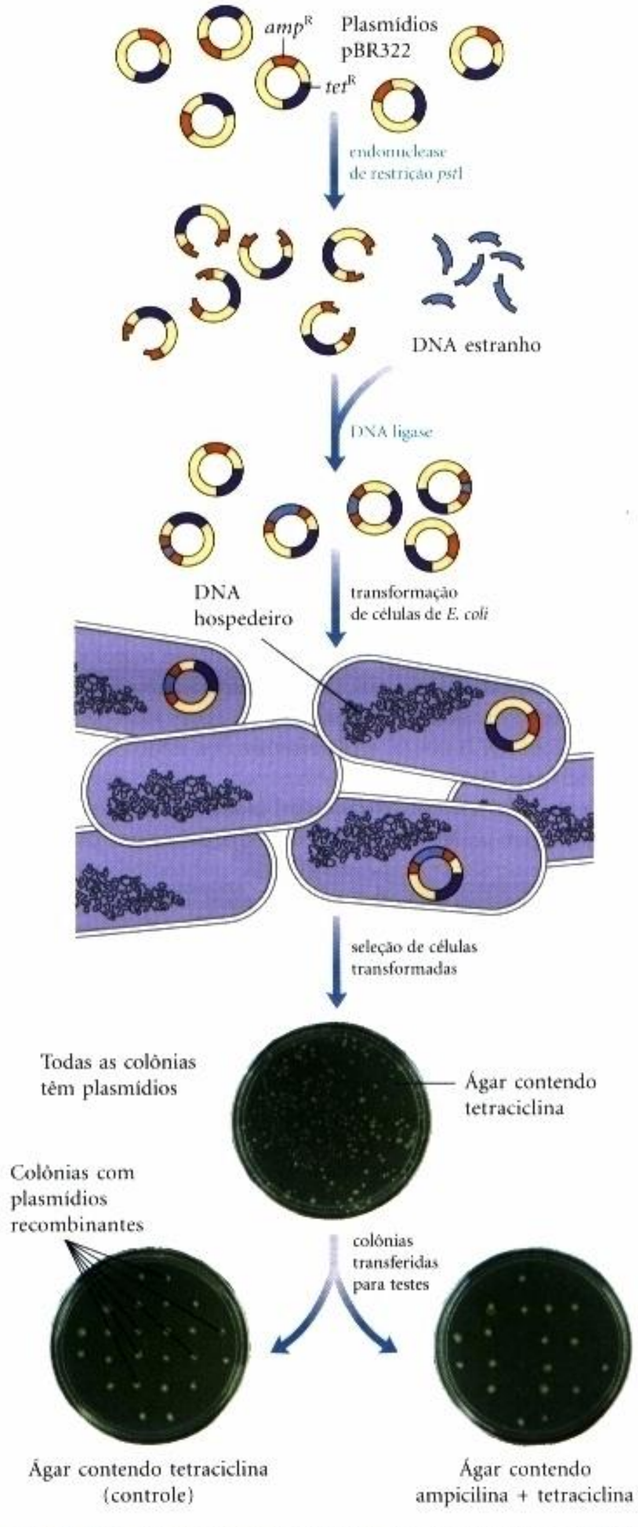

amp^R
Plasmídios pBR322
tet^R
endonuclease de restrição *pst*I
DNA estranho
DNA ligase
DNA hospedeiro
transformação de células de *E. coli*
seleção de células transformadas
Todas as colônias têm plasmídios
Ágar contendo tetraciclina
Colônias com plasmídios recombinantes
colônias transferidas para testes
Ágar contendo tetraciclina (controle)
Ágar contendo ampicilina + tetraciclina

Figura 29-6 – Clonagem de DNA estranho na *E. coli* com pBR322. Se o DNA estranho for inserido no sítio de restrição da *Pst*I, o elemento de resistência da ampicilina é rompido e inativado. Depois da ligação do DNA e transformação das células da *E. coli*, as células são cultivadas em placas de ágar contendo tetraciclina para selecionar aquelas que tenham captado o plasmídio. Utilizando-se palitos de dente estéreis, colônias individuais dessas placas de ágar são transferidas para a mesma posição, com auxílio de um replicador, a duas placas adicionais, uma contendo tetraciclina (controle) e a outra contendo ambas, tetraciclina e ampicilina. Aquelas células que cresceram na presença de tetraciclina, mas não formaram colônias na placa contendo tetraciclina e ampicilina, conterão plasmídios recombinantes (o elemento de resistência à ampicilina não é funcional). As células que contêm pBR322 que estava ligado, mas sem a inserção de um fragmento de DNA estranho, reterão a resistência à ampicilina e crescerão em ambas as placas. A identificação dos clones recombinantes exige seleção, seguida pelo rastreamento.

3. Várias seqüências únicas de reconhecimento para diferentes endonucleases de restrição fornecem sítios onde o plasmídio pode ser cortado e o DNA estranho inserido.
4. Um tamanho pequeno geralmente facilita a entrada do plasmídio nas células e a manipulação bioquímica do DNA.

A transformação de células bacterianas típicas com DNA purificado (nunca um processo muito eficiente) diminui à medida que o tamanho do plasmídio aumenta, e é difícil clonar segmentos de DNA maiores do que cerca de 15.000 pares de bases, quando os plasmídios são usados como vetores.

Bacteriófagos. O bacteriófago λ possui um mecanismo muito eficiente de colocar os seus 48.502 pares de bases de DNA dentro da bactéria e pode ser usado como um vetor para clonar alguma parte de segmentos grandes de DNA (Fig. 29-7). Duas características-chave contribuem para sua utilidade:

1. Cerca de um terço do genoma λ não é essencial e pode ser substituído pelo DNA estranho.
2. O DNA será empacotado em partículas infecciosas do fago apenas se elas contiverem entre 40.000 e 53.000 pares de bases de comprimento, uma limitação que pode ser usada para dirigir somente o empacotamento do DNA recombinante.

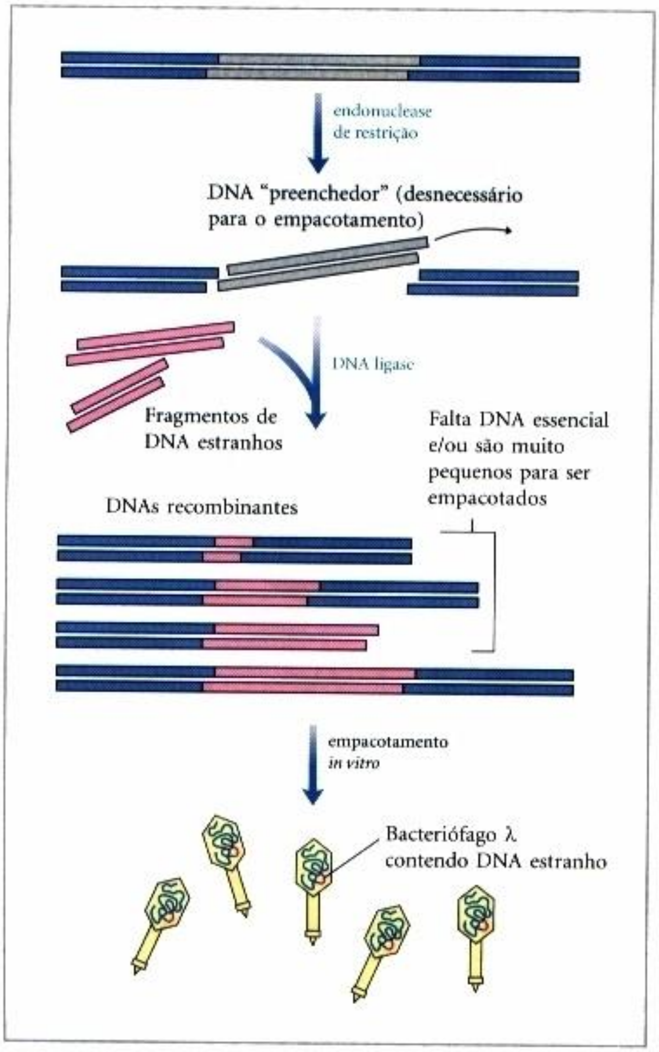

endonuclease de restrição
DNA “preenchedor” (desnecessário para o empacotamento)
DNA ligase
Fragmentos de DNA estranhos
Falta DNA essencial e/ou são muito pequenos para ser empacotados
DNAs recombinantes
empacotamento *in vitro*
Bacteriófago λ contendo DNA estranho

Figura 29-7 – Vetores de clonagem do bacteriófago λ. Métodos de DNA recombinante foram usados para remover do genoma do bacteriófago λ aqueles genes desnecessários para a produção de fagos, substituindo-os com o DNA "preenchedor", tornando o DNA do vetor fago suficientemente grande para o empacotamento em partículas do fago. Esse "preenchedor" é substituído com DNA estranho em experimentos de clonagem. Os recombinantes são empacotados em partículas de fagos viáveis *in vitro* somente se eles incluírem um DNA estranho de tamanho apropriado, assim como ambos os fragmentos de DNA das extremidades essenciais do fago λ.

Foram desenvolvidos vetores do bacteriófago λ que podem ser clivados facilmente em três pedaços, dois dos quais contêm genes essenciais, mas que juntos perfazem apenas 30.000 pares de bases de comprimento. O terceiro pedaço do DNA “preenchedor” no vetor é desprezado quando o vetor é usado para clonagem. O DNA adicional deve, portanto, ser inserido entre eles para produzir partículas viáveis do fago. De fato, o mecanismo de empacotamento seleciona os DNAs virais recombinantes. Vetores do bacteriófago λ permitem a clonagem de fragmentos de DNA de até 23.000 pares de bases. Assim que os fragmentos do bacteriófago λ são ligados ao fragmentos do DNA estranho de tamanho apropriado, os DNAs recombinantes resultantes podem ser empacotados em partículas virais, adicionando-os a extratos brutos de células bacterianas contendo todas as proteínas necessárias para montar um fago completo. Isso é chamado de **empacotamento *in vitro*** (Fig. 29-7). Todas as partículas viáveis do fago conterão um fragmento de DNA estranho. A subseqüente transmissão do DNA recombinante para as células da *E. coli* é altamente eficiente.

Cromossomo artificial de bactéria. Os cromossomos artificiais de bactéria (**BACs — “bacterial artificial chromosomes”**) são simples plasmídios designados para a clonagem de segmentos de DNA muito grandes (Fig. 29-8). Eles, geralmente, incluem um marcador seletivo, tais como resistência ao cloranfenicol (Cm^R), como também a origem de replicação muito estável (*ori*), a qual mantém o plasmídio com uma ou duas cópias por célula. Fragmentos de DNA com várias centenas de milhares de pares de bases em comprimento são clonados para vetores BAC. Grandes DNAs circulares são, portanto, introduzidos na bactéria hospedeira por meio da eletroporação. A bactéria usada como hóspede para BACs recombinantes apresenta mutações que comprometem a estrutura da parede bacteriana, facilitando a captação de grandes moléculas de DNA.

Isolando um Gene de um Cromossomo Celular

Pelo fato de um gene único ser apenas uma pequena parte de um cromossomo, isolar um fragmento de DNA, que contém um gene particular, freqüentemente requer dois procedimentos. Primeiro, constrói-se uma biblioteca de DNA que contenha muitos milhares de fragmentos de DNA derivados de um genoma. Segundo, o fragmento de DNA de interesse é identificado tirando vantagem de uma propriedade que o distinga de outros fragmentos de DNA — sua seqüência.

Clonar um gene freqüentemente requer uma biblioteca de DNA

As bibliotecas de DNA podem apresentar uma variedade de formas, dependendo da fonte do DNA. Entre as mais comuns, está a biblioteca genômica produzida quando o genoma completo de um organismo particular é clivado para milhares de fragmentos e todos são clonados pela inserção em um vetor de clonagem. Num primeiro passo, o DNA a ser clonado é parcialmente digerido, utilizando endonuclease de restrição, de tal modo que uma dada seqüência aparecerá em fragmentos de tamanhos variados. Uma escala de tamanho do fragmento é escolhida de modo que seja compatível com o vetor de clonagem e assegure virtualmente que todas as seqüências serão representadas entre

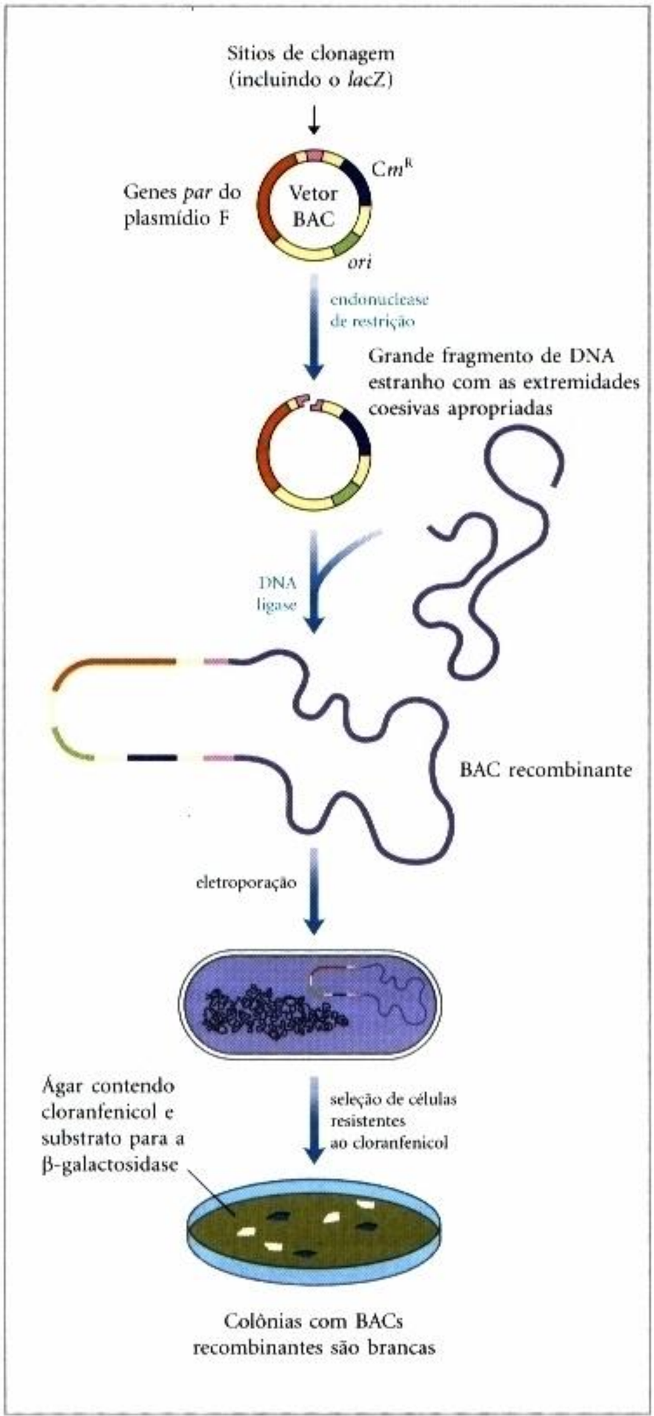

Sítios de clonagem
(incluindo o *lacZ*)
Cm^R
Genes *par* do plasmídio F
Vetor BAC
ori
endonuclease de restrição
Grande fragmento de DNA estranho com as extremidades coesivas apropriadas
DNA ligase
BAC recombinante
eletroporação
Ágar contendo cloranfenicol e substrato para a β-galactosidase
seleção de células resistentes ao cloranfenicol
Colônias com BACs recombinantes são brancas

Figura 29-8 – Clonando com cromossomo artificial de bactéria (BACs). O vetor é um plasmídio relativamente simples, com uma origem de replicação *ori* que dirige a replicação. Os genes *par*, derivados de um tipo de plasmídio denominado plasmídio F, facilitam a distribuição uniforme do plasmídio para as células filhas durante a divisão celular. Isso aumenta a probabilidade de cada célula filha conter uma cópia do plasmídio, mesmo quando poucas cópias estão presentes. O baixo número de cópias é útil na clonagem de grandes segmentos de DNA devido à limitação nas oportunidades de reações de recombinação indesejáveis, as quais podem imprevisivelmente alterar, com o tempo, grandes DNAs clonados. Marcadores seletivos são incluídos no BAC. Um gene *lacZ* está situado na região de clonagem de tal modo que é inativado por insertos de DNA clonados. A introdução dos BACs recombinantes nas células por eletroporação é facilitada pelo uso de células com uma parede celular alterada (mais porosa). Os DNAs recombinantes são rastreados pela resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cm). As placas contêm também um substrato artificial para a β-galactosidase, que resulta em um produto colorido. As colônias com a β-galactosidase ativa (vetor BAC sem inserto de DNA) ficam azuis, colônias com os insertos de DNA desejados são brancas.

os clones dentro da biblioteca. Fragmentos muito grandes ou muito pequenos são removidos por centrifugação ou eletroforese. O vetor de clonagem é igualmente clivado com a mesma endonuclease de restrição e ligado aos fragmentos de DNA genômico. A mistura de DNA ligado é usada para transformar células bacterianas ou é empacotado em partículas do bacteriófago (como descrito nas Figs. 29-6 a 29-8) gerando bactéria ou bacteriófago, cada um apresentando uma molécula de DNA recombinante diferente. Idealmente, todo o DNA do genoma estará representado na biblioteca.

Cada bactéria transformada cresce como uma colônia ou "clone" de células idênticas, cada uma apresentando o mesmo plasmídio recombinante. Quando o bacteriófago é usado como vetor, cada tipo de fago recombinante cria uma região clara de células lisadas (uma placa) dentro de uma camada de bactérias distribuída uniformemente na placa de ágar; todos os bacteriófagos recombinantes dentro de uma placa são idênticos. O desafio será então identificar o clone que contém o gene particular de interesse entre outros milhares de clones na biblioteca. Para se ter uma idéia da dimensão do problema, considere o caso de um mamífero com um DNA genômico de 3×10^9 pares de bases. Se BACs forem usados como vetores de clonagem e se o objetivo é ter uma probabilidade de 99% de que um desejado gene de seqüência única esteja representado na biblioteca, então a biblioteca deverá conter aproximadamente 50.000 BACs recombinantes, cada um com um inserto diferente de 300.000 pares de bases.

Os fragmentos numa biblioteca genômica derivada de um eucarioto superior inclui não somente os genes, mas também o DNA não codificador, o qual ocupa uma grande porção de muitos genomas eucarióticos. Um biblioteca de DNA mais especializada e exclusiva pode ser construída de tal modo a incluir somente aqueles genes que são expressos em um dado organismo ou mesmo em certas células ou tecidos. Genes expressos são aqueles transcritos para RNA. O mRNA de um organismo ou determinadas células de um organismo são primeiramente extraídos e então são produzidos os **DNAs complementares (cDNAs)** a partir do RNA numa reação de múltiplos passos catalisada pela transcriptase reversa (Fig. 29-9). Os fragmentos de DNA resultantes com dupla fita são então inseridos e clonados para um vetor conveniente, criando uma população de clones denominada **biblioteca de cDNA.** A busca de um gene particular pode ser facilitada por meio de uma biblioteca de cDNA produzida a partir dos mRNAs de uma célula que expressa esse gene. Por exemplo, a clonagem de genes da globina pode ser facilitada. Primeiro, criando uma biblioteca de cDNA a partir de células precursoras de eritrócitos, em que metade dos mRNAs codifica para globinas.

Seqüências específicas do DNA podem ser amplificadas

O projeto genoma humano, por meio de muitos esforços associados para seqüenciar genomas de vários tipos de organismos, está promovendo acesso nunca visto à informação de seqüência de gene. Enquanto a criação de uma ou mais bibliotecas de DNA, muitas vezes, tem sido um passo intermediário no seqüenciamento de um genoma, um gene pode, rapidamente, ser clonado sem a ajuda de uma biblioteca, uma vez que a seqüência genômica está completa. Se conhecemos a seqüência de, pelo menos, parte de um segmento do DNA a ser clonado, o número de cópias desse segmento de DNA pode ser enormemente amplificado, usando a **reação em cadeia da polimerase** (**PCR — "polymerase chain reaction"**), criada por Kary Mullis, em 1983. O DNA amplificado pode ser clonado diretamente ou usado em uma variedade de procedimentos analíticos.

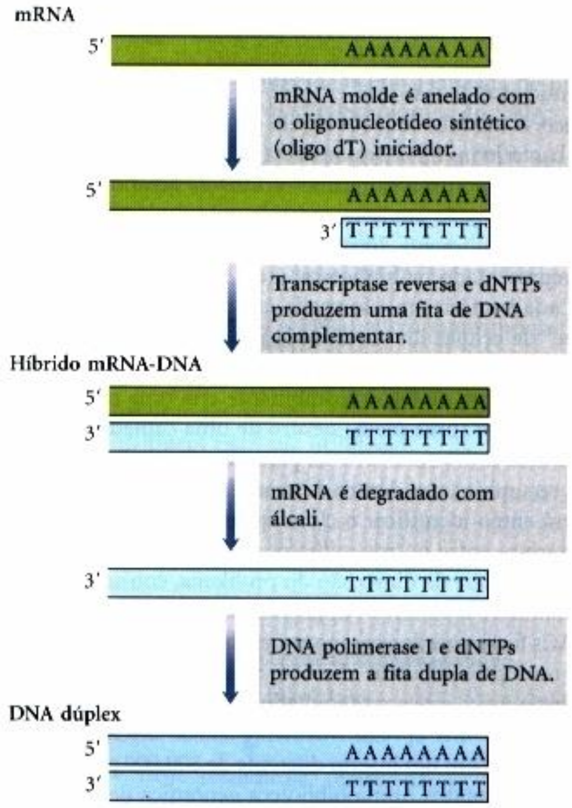

mRNA
5'
AAAAAAAA
mRNA molde é anelado com o oligonucleotídeo sintético (oligo dT) iniciador.
5'
AAAAAAAA
3' TTTTTTTT
Transcriptase reversa e dNTPs produzem uma fita de DNA complementar.
Híbrido mRNA-DNA
5'
AAAAAAAA
3'
TTTTTTTT
mRNA é degradado com álcali.
3'
TTTTTTTT
DNA polimerase I e dNTPs produzem a fita dupla de DNA.
DNA dúplex
5'
AAAAAAAA
3'
TTTTTTTT

Figura 29-9 – Construindo uma biblioteca de cDNA a partir do mRNA. Na prática, o mRNA, originado de uma célula, inclui transcritos de milhares de genes, e os cDNAs produzidos serão correspondentemente heterogêneos. O DNA dúplex produzido por este método é inserido em um vetor de clonagem apropriado.

A PCR tem uma simplicidade elegante. Dois oligonucleotídeos sintéticos, cada um complementar às seqüências das fitas opostas do DNA-alvo em posições justamente flanqueadoras das extremidades do segmento a ser amplificado. Os oligonucleotídeos servem como iniciadores da replicação, com as extremidades 3' das sondas hibridizadas orientadas uma em direção a outra e posicionadas para moldar a síntese de DNA por meio do segmento de DNA desejado (Fig. 29-10).

O DNA isolado, contendo o segmento para ser amplificado, é brevemente aquecido para desnaturar e, em seguida, esfriado na presença de um grande excesso dos oligonucleotídeos sintéticos iniciadores. Os quatro desoxinucleosídeos trifosfatos são, a seguir, adicionados, e o segmento de DNA-alvo é seletivamente replicado. O ciclo de aquecimento, esfriamento e replicação é repetido 25 ou 30 vezes durante poucas horas em um procedimento automático, amplificando o segmento do DNA flanqueado pelos iniciadores, podendo ser rapidamente analisado e/ou clonado. DNAs polimerases resistentes ao calor, tais como a *Taq*I polimerase (oriunda de uma bactéria que vive a 90°C), são usadas na PCR. A enzima permanece ativa após cada passo de aquecimento e não necessita ser reposta. O desenho cuidadoso dos iniciadores usados na PCR, tais como a inclusão de sítios de clivagem para endonucleases de restrição, pode facilitar a subseqüente clonagem do DNA amplificado (Fig. 29-10b).

O método da PCR é sensível o bastante para detectar e amplificar poucas moléculas de DNA em quase todo o tipo de amostra. Embora o DNA degrade lentamente com o passar do tempo (veja pág. 269), o DNA tem sido clonado com sucesso pela PCR, com amostras acima de 40.000 anos de idade. A técnica tem sido usada para clonar fragmentos de DNA originário de humanos que permaneceram mumificados e animais em extinção, tais como o mamute lanoso ("woolly mammoth"), criando novos campos de arqueologia e paleontologia moleculares. O DNA, oriundo de sítios arqueológicos, tem sido amplificado por PCR e utilizado para traçar as migrações humanas da Antiguidade. Epidemiologistas podem usar a PCR em DNA de amostras de restos humanos para traçar a evolução de viroses patogênicas humanas. Além de sua utilidade para a clonagem de DNA, a PCR é uma nova e potente ferramenta na medicina forense (Adendo 29-1). Ela também tem sido usada para a detecção de infecções virais, antes de causarem sintomas, e em diagnóstico pré-natal de uma larga variedade de doenças genéticas.

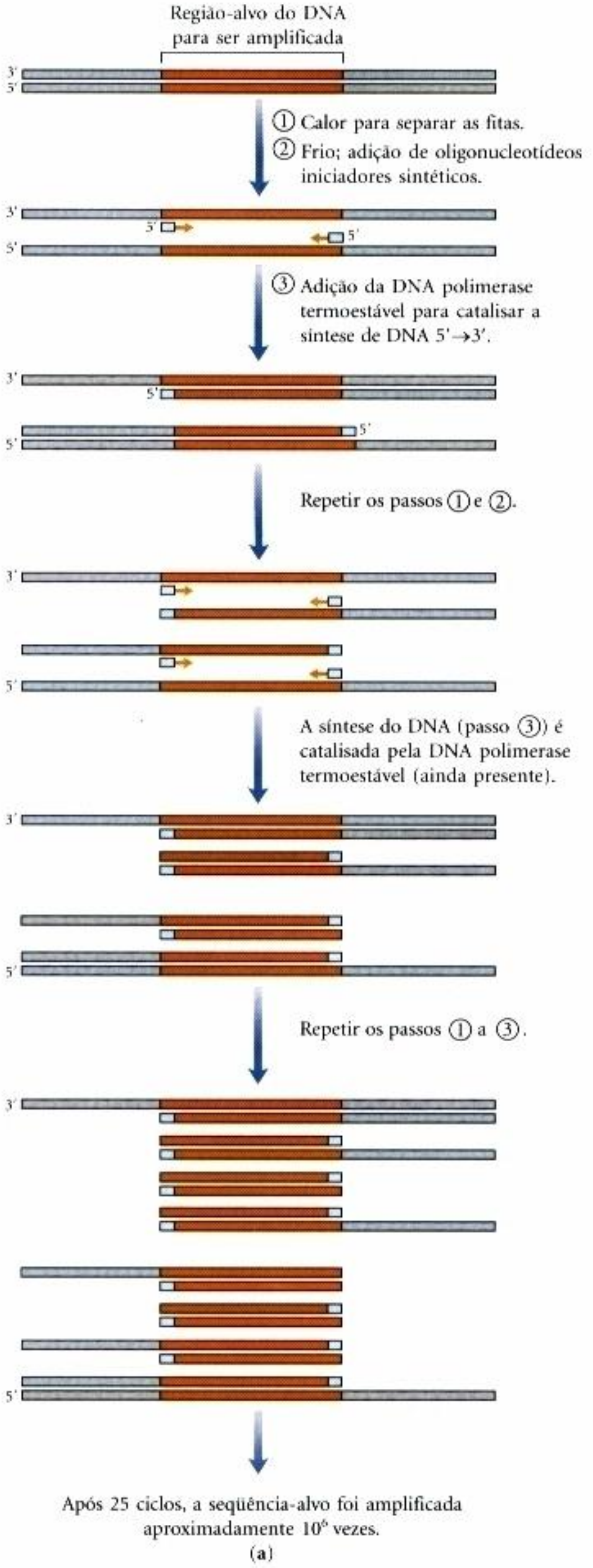
A hibridização permite a detecção de seqüências específicas

A hibridização do DNA, introduzida no Capítulo 10 (Fig. 10-32), é o processo mais comum baseado em seqüência para detectar um gene particular ou um segmento de ácido nucléico. Existem muitas variações do método básico, a maioria utiliza-se de RNA ou fragmento de DNA marcado (por radioatividade), como uma **sonda**, complementar ao DNA está sendo procurado. Em um procedimento clássico para detectar uma seqüência de DNA particular em uma biblioteca de DNA, um papel de nitrocelulose é prensado sobre uma placa de ágar, a qual contém muitas colônias individuais de bactéria originária de uma biblioteca, cada uma contendo um DNA recombinante diferente. Algumas células de cada colônia aderem ao papel, formando uma réplica da placa. O papel é tratado com álcali para romper as células e desnaturar o DNA ali presente, o qual permanece ligado à região do papel ao redor da colônia da qual ele é proveniente. A sonda de DNA radioativa é então adicionada ao papel, no qual ela anela somente com o DNA complementar. Após a lavagem para retirar a sonda de DNA que não anelou, o DNA hibridizado pode ser detectado por auto-radiografia (Fig. 29-11).

Freqüentemente, o passo limitante em detectar e/ou clonar um gene é a produção de uma fita complementar de ácido nucléico usada como sonda. A origem de uma sonda depende do que é conhecido do gene que está sendo analisado. Algumas vezes, um gene homólogo clonado em outras espécies pode ser usado como sonda. Alternativamente, se a proteína, que é o produto do gene, for purificada, sondas podem ser desenhadas e sintetizadas tomando como base a sua seqüência de aminoácidos e o conhecimento do código genético (Fig. 29-12). Finalmente, a informação necessária da seqüência do DNA pode ser obtida, a partir de seqüências, no banco de dados que detalha a estrutura de milhões de genes oriundos de vários organismos.

Matrizes do DNA fornecem bibliotecas compactas para o estudo dos genes e suas expressões

A explosão de informação da seqüência do DNA, oriunda dos projetos de seqüenciamento do genoma, revelou uma sóbria verdade. Apesar de muitos anos de avanços bioquímicos, existem ainda milhares de genes em células eucarióticas (e até mesmo alguns em bactérias) que são totalmente desconhecidos. Novos métodos são necessários para rastrear rapidamente seqüências genômicas e obter indícios a respeito da função do gene. Grandes refinamentos da tecnologia envolvida com bibliotecas de DNA, PCR e hibridização caminham juntos no desenvolvimento do **microarranjo do DNA** (algumas vezes, chamado de fibras de DNA) que permitem o rápido e simultâneo rastreamento de muitos milhares de genes. Segmentos de DNA oriundos de ge-


Região-alvo do DNA
para ser amplificada
3'
5'
① Calor para separar as fitas.
② Frio; adição de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos.
3'
3'
5'
5'
③ Adição da DNA polimerase termoestável para catalisar a síntese de DNA 5'→3'.
3'
5'
5'
5'
Repetir os passos ① e ②.
3'
5'
A síntese do DNA (passo ③) é catalisada pela DNA polimerase termoestável (ainda presente).
3'
5'
Repetir os passos ① a ③.
3'
5'
Após 25 ciclos, a seqüência-alvo foi amplificada aproximadamente 10^6 vezes.
(a)

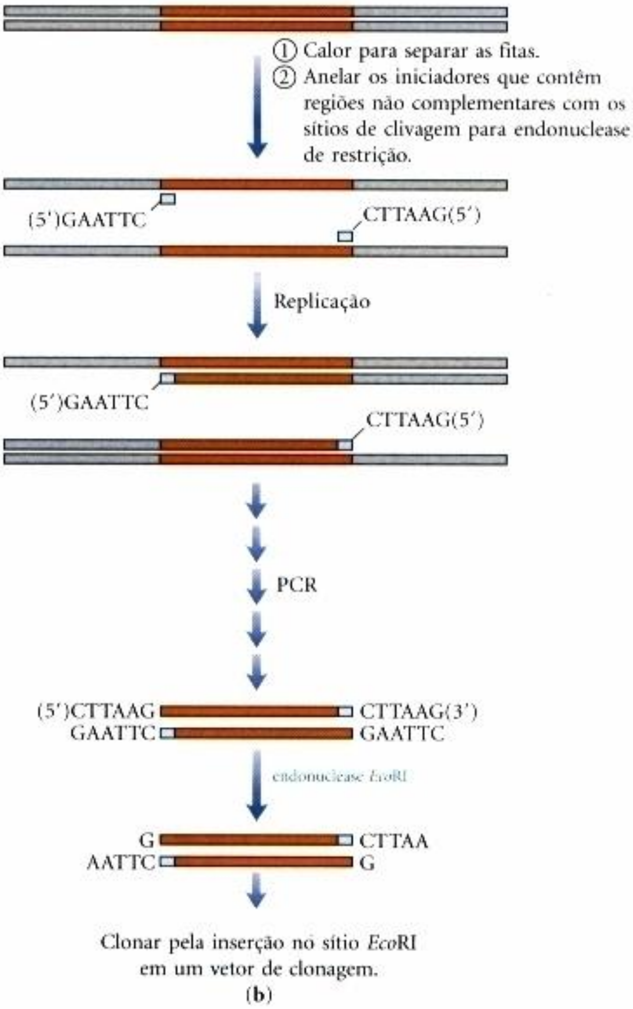

① Calor para separar as fitas.
② Anelar os iniciadores que contêm regiões não complementares com os sítios de clivagem para endonuclease de restrição.
(5')GAATTC
CTTAAG(5')
Replicação
(5')GAATTC
CTTAAG(5')
PCR
(5')CTTAAG
CTTAAG(3')
GAATTC
GAATTC
endonuclease EcoRI
G
CTTAA
AATTC
G
Clonar pela inserção no sítio EcoRI em um vetor de clonagem.
(b)

Figura 29-10 – Amplificação de um segmento de DNA específico usando a reação em cadeia da polimerase. (**a**) O procedimento apresenta três passos. ① As fitas do DNA são separadas pelo aquecimento, e ② aneladas a um excesso de iniciadores de DNA curtos e sintéticos (azul), os quais flanqueiam a região a ser amplificada. Após a polimerização ③, o processo é repetido em 25 ou 30 ciclos. A DNA polimerase termoestável *Taq*I (originada da *Thermus aquaticus*, uma bactéria que cresce em fontes de água quente) não é desnaturada durante os passos que envolvem aquecimento. (**b**) O DNA amplificado pela PCR pode ser clonado. Os iniciadores podem incluir DNA não complementar nas extremidades, contendo sítios de clivagem para endonucleases de restrição. Embora essas regiões dos iniciadores não anelam com o DNA-alvo, o procedimento de PCR incorpora-as para o DNA que é amplificado. A clivagem dos fragmentos amplificados nesses sítios criam extremidades coesivas que facilitam a ligação do DNA amplificado para um vetor de clonagem.

Adendo 29-1 Uma potente arma na medicina forense

Tradicionalmente, um dos métodos mais precisos para colocar um indivíduo na cena do crime tem sido a impressão digital. Uma técnica que é baseada em métodos desenvolvidos para a tecnologia do DNA recombinante, **impressão digital do DNA** (também chamada de tipagem do DNA ou perfil do DNA) pode ser mais poderosa do que qualquer outro método de identificação.

A impressão digital do DNA é baseada nos **polimorfismos de seqüências.** Existem pequenas diferenças de seqüência (usualmente alterações únicas de pares de bases) que ocorrem de indivíduo para indivíduo, uma para cada 500 a 1.000 pares de bases, em média. Cada diferença da seqüência de assimetria ajustada do genoma humano está geralmente presente em apenas uma fração da população humana; cada indivíduo possui algumas delas. Algumas das alterações de seqüência afetam os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição, resultando numa variação de indivíduo para indivíduo, no tamanho de certos fragmentos de DNA produzidos pela digestão com uma enzima de restrição particular. Essas diferenças de tamanho são referidas como **polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs).**

A detecção dos RFLPs depende de um procedimento de hibridização especial chamado de **Southern blotting** (Fig. 1). Os fragmentos de DNA, originados da digestão do DNA genômico pelas endonucleases de restrição, são primeiramente separados de acordo com o seu tamanho, por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos de DNA são desnaturados embebendo-se o gel em álcali, depois transferidos para o papel de nitrocelulose, de forma a reproduzir no papel a distribuição dos fragmentos no gel. O papel é então imerso numa solução contendo uma sonda de DNA radioativamente marcada. A sonda para uma seqüência, que é repetitiva várias vezes no genoma humano, geralmente identifica alguns dos milhares de fragmentos de DNA produzidos quando o genoma humano é digerido com uma endonuclease de restrição. Os fragmentos que hibridizam com a sonda são revelados pela auto-radiografia, como mostra a Figura 29-11.

As seqüências do DNA genômico usadas nesses testes são geralmente regiões que contêm DNA repetitivo (seqüências curtas repetidas milhares de vezes; veja pág. 715), que são comuns no genoma dos eucariotos superiores. O número de unidades repetidas em tal DNA varia de indivíduo para indivíduo (exceto em casos de gêmeos idênticos). Se uma sonda apropriada for escolhida, o padrão das bandas em tal experimento pode ser distinto para cada indivíduo testado. Se várias sondas forem usadas, o teste pode ser feito tão seletivamente que pode identificar positivamente um único indivíduo na população humana. Entretanto, o procedimento da transferência do tipo Southern requer amostras de DNA relativamente frescas e quantidades de DNA maiores que aquelas que geralmente estão presentes na cena do crime. Para aumentar a sensibilidade, a análise de RFLP está sendo aumentada por métodos da reação em cadeia da polimerase (PCR) (veja Fig. 29-10a), os quais permitem que ínfimas quantidades de DNA sejam ampliadas. Isso permite que a impressão digital do DNA seja obtida de um único fio de cabelo, uma gota de sangue, uma pequena amostra de sêmen de uma vítima estuprada, ou de amostras que possam ter meses ou até mesmo muitos anos de idade.

Esses métodos têm sido desenvolvidos a ponto de ser decisivos em casos levados a julgamento no mundo inteiro. No exemplo da Figura 1, o DNA de uma amostra de sêmen, obtida de uma vítima estuprada e morta, foi analisado paralelamente a amostras de DNA da vítima e de dois suspeitos. Cada uma das amostras de DNA foi clivada em fragmentos e estes separados por eletroforese em gel. Sondas de DNA radioativas foram usadas para identificar um pequeno subconjunto desses fragmentos que continha seqüências complementares à sonda. Os tamanhos dos fragmentos identificados variavam de um indivíduo para o outro, como visto aqui em padrões diferentes para os três indivíduos testados (vítima e dois suspeitos). O DNA de um dos suspeitos do estupro exibia um padrão de bandeamento idêntico àquele da amostra do sêmen tirada da vítima. Uma sonda foi usada aqui, mas três ou qua-

nes conhecidos, com tamanho variando de algumas dezenas até centenas de nucleotídeos, são inseridos sobre uma superfície sólida, por meio de mecanismo robótico, o qual deposita de uma maneira precisa quantidades de nanolitros de uma solução de DNA. Milhares de pontos são depositados em um arranjo predeterminado sobre uma superfície medindo apenas alguns centímetros quadrados. Um exemplo dramático dessa técnica aparece no início da Parte IV deste livro (pág. 710). Segmentos oriundos de cada um dos mais de 6.000 genes no genoma da levedura completamente seqüenciados foram separadamente amplificados pela PCR e cada um foi depositado em um padrão definido para criar um microarranjo. Uma estratégia alternativa é sintetizar o DNA diretamente sobre a superfície sólida.

O microarranjo pode responder questões como quais genes são expressos em um dado estágio de desenvolvimento de um organismo. O mRNA total é isolado de células em dois estágios diferentes do desenvolvimento e convertido em cDNA usando a transcriptase reversa e desoxinucleotídeos marcados com fluoresceína. Os cDNAs marcados fluorescentemente podem ser misturados e usados como sondas, em que cada um hibridizará com as seqüências complementares sobre o microarranjo (Fig. 29-13). Nesse exemplo, os nucleotídeos usados na construção do cDNA para cada amostra fluoresce em duas cores diferentes. Os cDNA oriundos de duas amostras são misturados e usados para sondar o microarranjo. Os pontos que fluorescem em verde representam mRNA mais abundantes em um simples estágio cetro sondas diferentes poderiam ser usadas (em experimentos separados) para fazer uma identificação positiva. Os resultados têm sido usados para ajudar os suspeitos, tanto o convicto quanto o inocente, e para estabelecer a paternidade com um grau extraordinário de certeza. O impacto dessa tecnologia, no julgamento de casos, continuará a crescer à medida que os padrões sejam aceitos e os métodos tornem-se largamente estabelecidos nos laboratórios forenses. Mesmo misteriosos crimes de décadas passadas podem ser solucionados: em 1996, a impressão digital do DNA foi usada para auxiliar a confirmação da identificação da ossada do último czar da Rússia e sua família, assassinados em 1918.

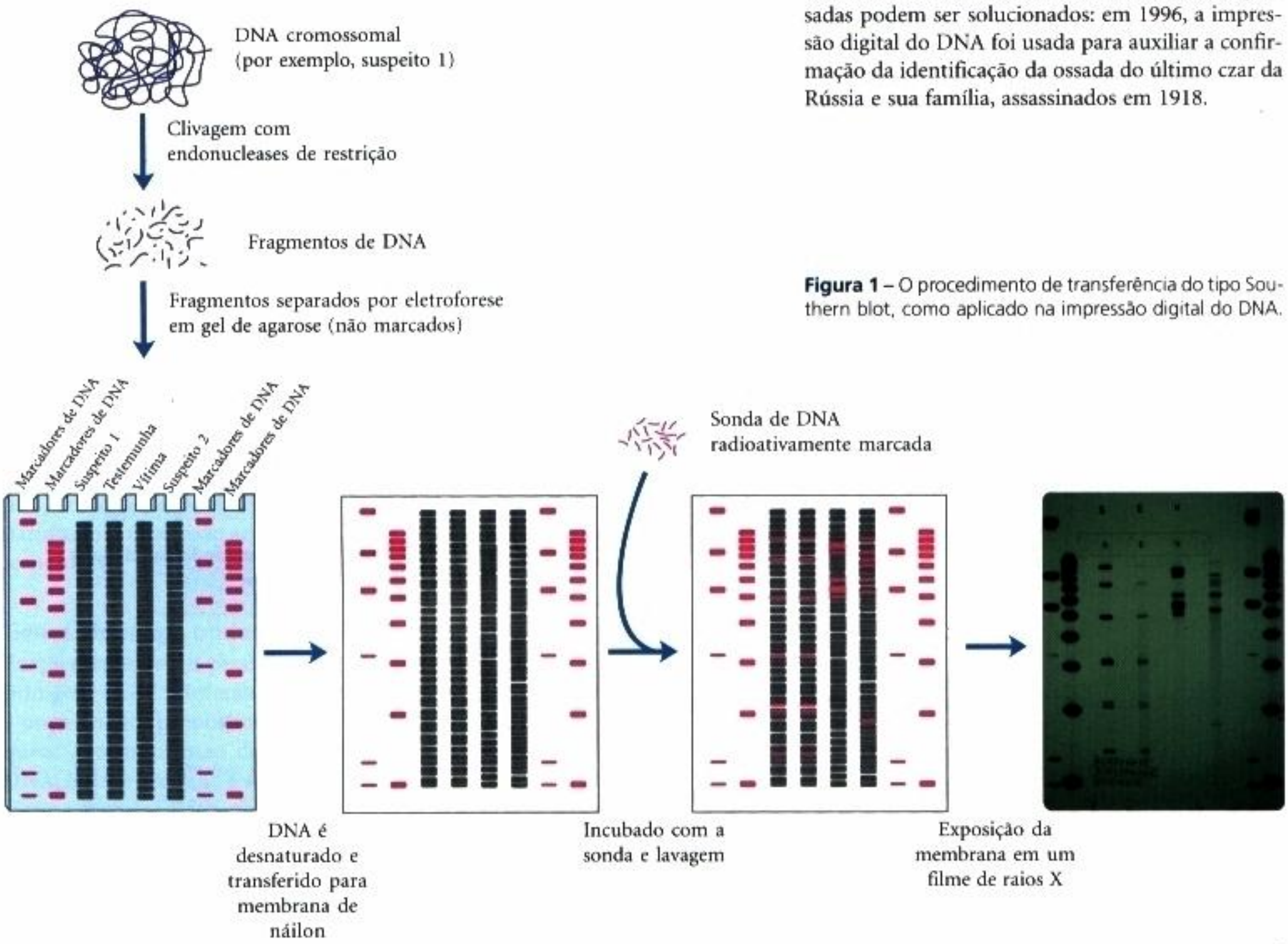

DNA cromossomal
(por exemplo, suspeito 1)
Clivagem com endonucleases de restrição
Fragmentos de DNA
Fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose (não marcados)
Marcadores de DNA
Marcadores de DNA
Suspeito 1
Testemunha
Vítima
Suspeito 2
Marcadores de DNA
Marcadores de DNA
Sonda de DNA radioativamente marcada
DNA é desnaturado e transferido para membrana de náilon
Incubado com a sonda e lavagem
Exposição da membrana em um filme de raios X

Figura 1 – O procedimento de transferência do tipo Southern blot, como aplicado na impressão digital do DNA.

lular; aqueles que flourescem em vermelho representam seqüências mais expressas no estágio tardio do desenvolvimento. Usando-se uma mistura de duas amostras para a medida relativa da quantidade de seqüências, ao contrário da medida absoluta, são corrigidas as variações nas quantidades de DNA originalmente depositadas em cada ponto sobre a malha e outras inconsistências que possam existir de um ponto a outro no microarranjo. Os pontos que fluorescem representam um sinal instantâneo de todos os genes que estão sendo expressos nas células no momento em que eles foram isolados, é a expressão gênica examinada sobre uma larga escala do genoma. Para um gene de função desconhecida, o tempo e as circunstâncias da sua expressão podem fornecer importantes indícios de seu papel na célula.

Aplicações da Tecnologia do DNA Recombinante

Normalmente, clonar um gene é apenas a primeira etapa de um planejamento muito maior, como a produção em grandes quantidades do seu produto protéico. A seqüência de aminoácidos da proteína pode ser alterada introduzindo mudanças nos pares de bases do gene, uma estratégia que pode ser muito poderosa na exploração do enrolamento, da estrutura e da função protéica. Métodos progressivamente mais sofisticados para transferir o DNA para dentro e para fora das células de qualquer tipo estão fornecendo um outro caminho para o estudo da função e regulação do gene e estão permitindo a introdução de novas características em plantas e animais.

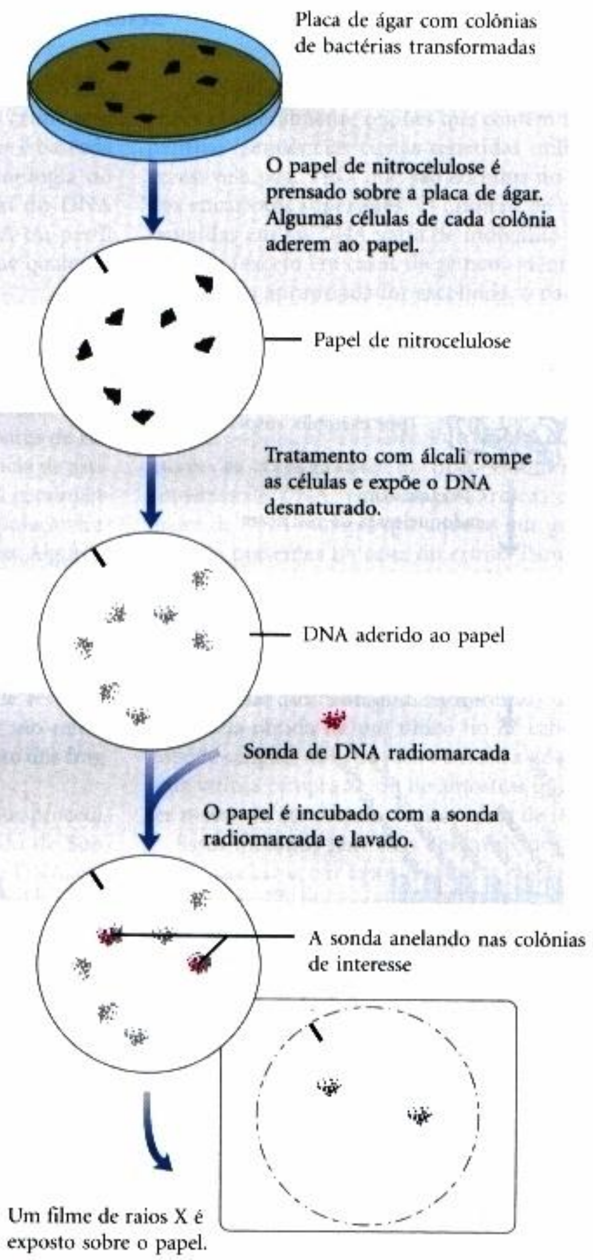

Placa de ágar com colônias de bactérias transformadas
O papel de nitrocelulose é prensado sobre a placa de ágar. Algumas células de cada colônia aderem ao papel.
Papel de nitrocelulose
Tratamento com álcali rompe as células e expõe o DNA desnaturado.
DNA aderido ao papel
Sonda de DNA radiomarcada
O papel é incubado com a sonda radiomarcada e lavado.
A sonda anelando nas colônias de interesse
Um filme de raios X é exposto sobre o papel.

Figura 29-11 – Identificação de um clone por meio da hibridização com um segmento de DNA particular. A sonda de DNA radioativa hibridiza com o DNA complementar, que é revelado por auto-radiografia. Após as colônias marcadas terem sido identificadas, as colônias correspondentes na placa de ágar original podem ser usadas como fonte do DNA clonado em estudos posteriores.

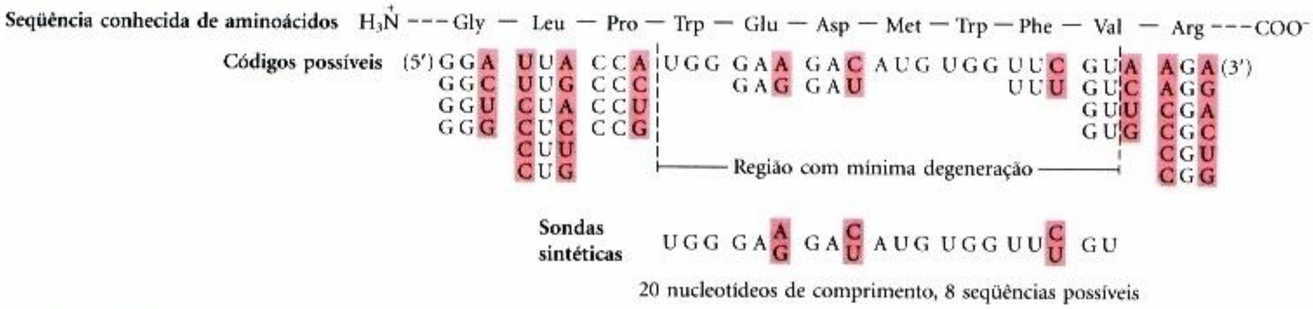

Seqüência conhecida de aminoácidos $H_3\overset{+}{N}$---Gly — Leu — Pro — Trp — Glu — Asp — Met — Trp — Phe — Val — Arg---COO^-
Códigos possíveis
(5′) GGA UUA CCA UGG GAA GAC AUG UGG UUC GUA AGA (3′)
GGC UUG CCC GAG GAU UUU GUC AGG
GGU CUA CCU GUU CGA
GGG CUC CCG GUG CGC
CUU CGU
CUG CGG
Região com mínima degeneração
Sondas sintéticas
UGG GA$\frac{A}{G}$ GA$\frac{C}{U}$ AUG UGG UU$\frac{C}{U}$ GU
20 nucleotídeos de comprimento, 8 seqüências possíveis

Figura 29-12 – Desenho de uma sonda para detectar o gene a partir do conhecimento da seqüência de aminoácidos da proteína. A degeneração do código genético significa que mais de uma seqüência de DNA pode codificar um dada seqüência de aminoácido. Como a correta seqüência de DNA não pode ser conhecida previamente, a sonda é desenhada para ser complementar a uma região do gene com um mínimo de degeneração (possíveis poucos códigos). Os oligonucleotídeos são sintetizados com seqüências seletivamente randômicas, de tal modo que ela contenha qualquer um dos dois possíveis nucleotídeos em cada posição de potencial degeneração (sombreado em vermelho). Neste exemplo, o oligonucleotídeo sintetizado é atualmente uma mistura de oito seqüências diferentes: uma das oitos complementará perfeitamente o gene e todas as oitos irão emparelhar em, pelo menos, 17 a 20 posições.

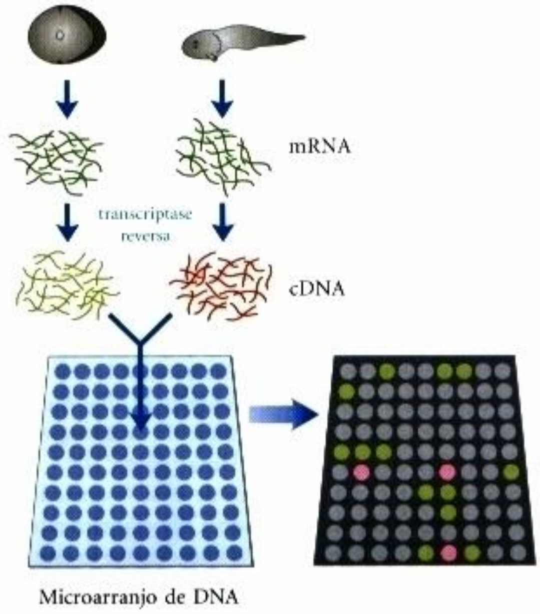


Figura 29-13 – Construção de uma matriz de DNA. Qualquer seqüência conhecida de DNA, oriunda de qualquer fonte, pode ser usada em um microarranjo. O DNA pode ser gerado pela síntese química ou PCR. O DNA é posicionado sobre uma superfície sólida (usualmente lâminas de vidro especialmente tratadas) com a ajuda de um mecanismo robótico capaz de depositar pontos muito pequenos (nanolitros) de arranjos precisos. A luz UV é utilizada para fixar o DNA na lâmina de vidro. Estando o DNA fixo, o microarranjo pode ser rastreado com outros ácidos nucléicos marcados com fluorescência. Por exemplo, o mRNA isolado de uma célula (representando todos os genes expressos nessa célula) pode ser convertido para sondas de cDNA por meio da transcriptase reversa, usando os dNTPs marcados com fluorescência. Os cDNAs fluorescentes anelam-se às seqüências complementares no microarranjo. Após a remoção da sonda que não hibridizou, cada ponto que fluoresce representa um gene que está sendo expresso na amostra.

Aqui, as amostras de mRNA foram coletadas de células em dois estágios diferentes de desenvolvimento de uma rã. As sondas de cDNA para cada amostra foram feitas com nucleotídeos que fluorescem com cores diferentes; uma mistura de cDNAs é usada para sondar o microarranjo. Os pontos que fluorescem em verde representam mRNAs mais abundantes no estágio de uma única célula, enquanto os pontos que fluorescem em vermelho representam seqüências mais abundantes num estágio mais tardio do desenvolvimento.

Nosso foco agora volta-se para as aplicações da clonagem do DNA, iniciando com as proteínas produzidas por genes clonados. Descreveremos depois procedimentos de clonagem usados para uma variedade de células eucarióticas, antes de terminarmos com uma visão geral do potencial e das implicações dessa tecnologia.

Genes clonados podem ser expressos

Freqüentemente é o produto do gene clonado em vez do próprio gene que é o interesse primário, particularmente quando a proteína tem propósitos comerciais, terapêuticos ou de pesquisa. A compreensão dos fundamentos do metabolismo do DNA, RNA e proteína e sua regulação na *E. coli* tornaram possíveis a expressão de genes clonados para estudar os seus produtos protéicos.

Pelo fato de muitos genes eucarióticos não terem a seqüência dos elementos (promotores etc.) de DNA requeridos para a sua expressão em células da *E. coli*, seqüências reguladoras bacterianas para a transcrição e tradução devem ser inseridas nas posições apropriadas no DNA do vetor, relativas ao próprio gene eucariótico. Em alguns casos, os genes clonados são expressos tão bem que o produto protéico é superproduzido, representando algumas vezes 10% ou mais da proteína celular. Uma tão alta concentração de uma proteína estranha pode matar uma célula da *E. coli*; nesses casos, a expressão gênica deve ser limitada até algumas horas antes da coleta planejada das células.

Vetores de clonagem, que tenham os sinais de transcrição e tradução necessários para a expressão regulada de um gene clonado, são freqüentemente chamados de **vetores de expressão**. A taxa de expressão do gene clonado é controlada pela substituição das seqüências reguladoras e promotoras do próprio gene com versões mais convenientes e eficientes suplementadas pelo vetor. Geralmente, um promotor bem caracterizado e seus elementos regulatórios são posicionados próximo a vários sítios de restrição usados na clonagem, de tal modo que os genes inseridos nos sítios de restrição serão expressos a partir da regulação do promotor (Fig. 29-14). Alguns desses vetores incorporam outras características, como sítios de ligação ao ribossomo bacteriano, para aumentar a translação do mRNA oriundo do gene e/ou de seqüências de terminação da transcrição. A superexpressão de genes clonados em bactérias e outras células tem fornecido grandes quantidades de proteínas específicas, simplificando o trabalho dos pesquisadores ou fornecendo grandes rendimentos para a indústria.

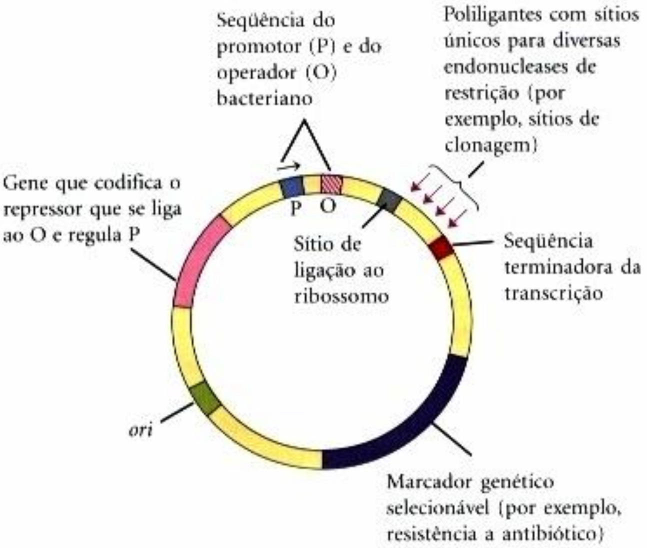

Seqüência do promotor (P) e do operador (O) bacteriano
Poliligantes com sítios únicos para diversas endonucleases de restrição (por exemplo, sítios de clonagem)
Gene que codifica o repressor que se liga ao O e regula P
P
O
Sítio de ligação ao ribossomo
Seqüência terminadora da transcrição
ori
Marcador genético selecionável (por exemplo, resistência a antibiótico)

Figura 29-14 – Tipos de seqüências de DNA encontrados em um vetor típico de expressão da *E. coli*. O gene a ser expresso é inserido num dos sítios de restrição no poliligante, perto do promotor, com a extremidade codificando o aminoterminal próximo ao promotor. O promotor permite eficiente transcrição do gene inserido e a seqüência terminadora da transcrição pode melhorar a quantidade e a estabilidade do mRNA produzido. O operador permite a regulação por meio de um repressor que se liga a ele (pág. 848). O sítio de ligação ao ribossomo fornece a seqüência com os sinais necessários para a translação eficiente do mRNA derivado do gene. O marcador de seleção permite a seleção das células que contêm o DNA recombinante.

Genes clonados podem ser alterados

As técnicas de clonagem podem ser usadas não somente para produzir proteínas em grande quantidade, mas também para produzir produtos protéicos sutilmente alterados a partir das suas formas nativas. Aminoácidos podem ser individualmente substituídos pela **mutagênese sítio-dirigida**. Essa metodologia poderosa, usada para estudar a estrutura e a função da proteína, altera a seqüência de aminoácido de uma proteína modificando a seqüência de DNA do gene clonado.

Se sítios de restrição apropriados flanquearem a seqüência a ser alterada, uma alteração pode ser feita simplesmente removendo um segmento de DNA e substituindo-o por um sintético que seja idêntico ao original, exceto pela alteração desejada (Fig. 29-15a). Se não existirem sítios de restrição nos locais apropriados, uma abordagem chamada de **mutagênese oligonucleotídeo dirigida** pode ser usada para criar uma alteração específica na seqüência do DNA (Fig. 29-15b). Uma fita de DNA sintética curta, com uma alteração específica de base, é anelada a uma cópia da fita simples do gene clonado. O despareamento de um par de bases em 15 ou 20 não afeta o anelamento se este for realizado em temperatura apropriada. Essa fita anelada é então utilizada como um iniciador para a síntese de uma fita complementar para o plasmídio vetor. O plasmídio dúplex recombinante é introduzido na bactéria, onde o despareamento é reparado por enzimas celulares de reparo do DNA. Cerca da metade dos eventos de reparo removerá e substituirá a base alterada; entretanto, a outra metade removerá e substituirá a base *normal*, retendo a mutação desejada. Transformantes são selecionados (freqüentemente pelo seqüenciamento do seu DNA plasmidial) até que seja encontrada uma colônia bacteriana com a seqüência alterada.

Alterações envolvendo mais de um par de bases podem também ser introduzidas. Partes grandes de um gene podem ser deletadas cortando um segmento com endonucleases de restrição e ligando as porções remanescentes formando um gene menor. Partes de dois genes diferentes podem ser ligadas, criando novas combinações. O produto de tal gene fundido é chamado de **proteína de fusão**. (Observe que essas "proteínas de fusão" não estão relacionadas às proteínas de fusão que participam no processo de fusão de membranas, discutidas no Capítulo 12).

Existem métodos engenhosos para realizar qualquer alteração gênica *in vitro*. A reintrodução nas células permite que as conseqüências da alteração sejam investigadas. A mutagênese sítio-dirigida tem facilitado muito a pesquisa de proteínas, permitindo, aos investigadores, realizar alterações específicas na estrutura primária de uma proteína e examinar o efeito dessas alterações no enrolamento, na estrutura tridimensional e na atividade catalítica da proteína. A mutagênese sítio-dirigida está também sendo utilizada comercialmente para criar proteínas com atividade aumentada ou com capacidade de funcionar em extremos da temperatura e pH ou em ambientes hostis, como solventes orgânicos.

A levedura é um hospedeiro eucariótico importante para o DNA recombinante

A engenharia genética, de forma alguma, está restrita à *E. coli* como célula hospedeira. Entre os eucariotos, as leveduras são organismos particularmente convenientes para esse trabalho. Como um *E. coli*, a genética de levedura é uma disciplina bem desenvolvida; o genoma da levedura mais utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, contém apenas 14×10^6 pares de bases (um genoma simples para os padrões eucarióticos, menos de 4 vezes o cromossomo da *E. coli*) e sua seqüência é conhecida na integridade; finalmente a levedura é um microrganismo muito fácil de se manter e crescer em larga escala no laboratório.

Vetores de expressão têm sido construídos para a levedura, empregando os mesmos princípios que os dos vetores da *E. coli* descritos anteriormente. A expressão de genes eucarióticos na levedura é, algumas vezes, preferível à expressão na *E. coli*. Muitas proteínas eucarióticas são normalmente modificadas após a translação pelas enzimas que são ausentes na bactéria, assim, muitas proteínas eucarióticas produzidas em bactérias podem não possuir modificações essenciais para a sua atividade. A disponibilidade de métodos convenientes para transferir o DNA para dentro e para fora das células de leveduras facilita o estudo de muitos aspectos da bioquímica da célula eucariótica. Nas células de leveduras transformadas, o DNA introduzido pode ser integrado ao cromossomo celular por recombinação homóloga (Capítulo 25). Essa **transformação integrativa** ocorre com baixa freqüência.

A eficiência da transformação pode ser aumentada pela introdução do DNA clonado num plasmídio auto-replicativo. Um plasmídio de levedura de ocorrência natural chamado de plasmídio 2 mícron (2μm) foi construído para criar uma variedade de vetores de clonagem que incorporam uma origem de replicação e outras seqüências necessárias para a manutenção do plasmídio na levedura. Alguns plasmídios recombinantes incorporam múltiplas origens de replicação e outros elementos que lhes permitam ser mantidos em mais de uma espécie (por exemplo, levedura ou *E. coli*). Plasmídios que podem ser propagados em células de duas ou mais espécies diferentes são chamados de **vetores ida-e-volta**.

Grandes segmentos de DNA podem ser clonados em cromossomo artificial de levedura

Um vetor de clonagem com a capacidade para incorporar grandes segmentos de DNA pode reduzir o número de clones individuais necessários para cobrir o genoma de um organismo em uma biblioteca genômica, com isso, reduzirá o número de clones que necessitam ser rastreados para identificar aquele clone que contém um particular gene de interesse. O trabalho com genomas grandes associado à necessidade de vetores de clonagem de alta capacidade desenvolveu o **cromossomo artificial de levedura** (YACs — **"yeast artificial chromosomes"** —, Fig. 29-16).

Vetores YACs contêm todos os elementos necessários para manter um cromossomo eucariótico no núcleo da levedura (veja Fig. 24-3). Isso inclui uma origem de replicação, um centrômero, telômeros e dois marcadores selecionáveis. Antecedendo o seu uso na clonagem, o vetor é propagado como um plasmídio circular de bactéria. A clivagem com a endonuclease de restrição (*Bam*HI na Fig. 29-16) remove um segmento de DNA entre duas seqüências teloméricas, deixando os telômeros e as extremidades do DNA linearizados. A clivagem em um outro sítio interno (como o da *Eco*RI na Fig. 29-16) divide o vetor em dois segmentos de DNA, referidos como braços do vetor, cada um contendo um diferente marcador seletivo.

O DNA genômico é preparado pela digestão parcial com endonucleases de restrição (*Eco*RI, como na Fig. 29-16). Os fragmentos genômicos são então separados por **eletroforese de campo pulsado**, uma variação da eletroforese em gel (veja Fig. 5-19) que permite a separação de grandes segmentos de DNA. Os fragmentos de DNA de tamanho apropriado (até aproximadamente

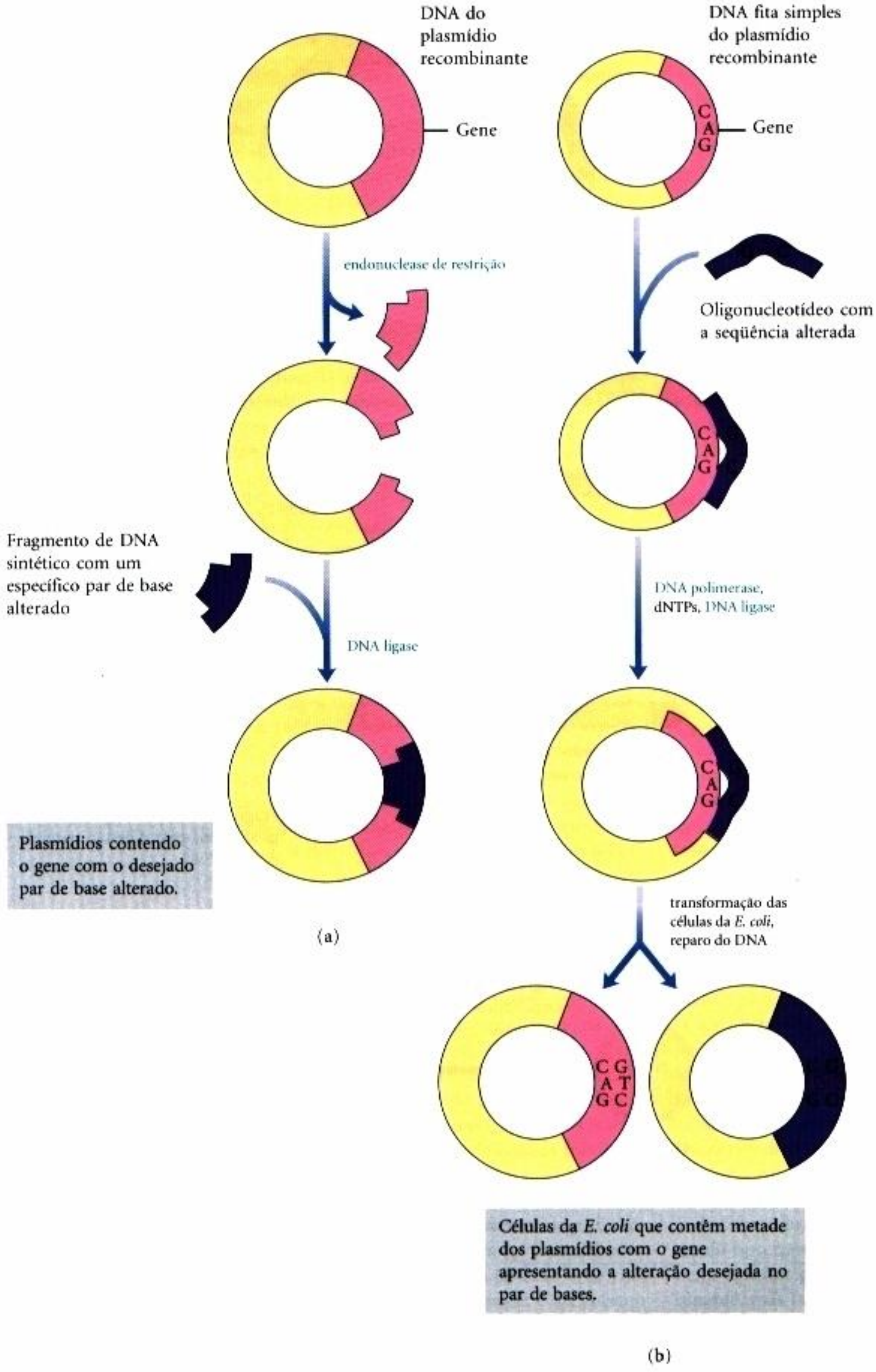

DNA do plasmídio recombinante
Gene
DNA fita simples do plasmídio recombinante
C
A
G
Gene
endonuclease de restrição
Oligonucleotídeo com a seqüência alterada
C
A
G
Fragmento de DNA sintético com um específico par de base alterado
DNA ligase
DNA polimerase, dNTPs, DNA ligase
C
A
G
Plasmídios contendo o gene com o desejado par de base alterado.
(a)
transformação das células da *E. coli*, reparo do DNA
C G
A T
G C
Células da *E. coli* que contêm metade dos plasmídios com o gene apresentando a alteração desejada no par de bases.
(b)

Figura 29-15 – Duas abordagens para a mutagênese sítio-dirigida. (**a**) Um segmento de DNA é sintetizado e usado para substituir um fragmento de DNA que foi removido pela clivagem com uma endonuclease de restrição. (**b**) Um oligonucleotídeo é sintetizado com uma seqüência desejada alterada em um ponto. Esta é hibridizada a uma cópia da fita simples do gene a ser alterado e funciona como um iniciador para a síntese do DNA dúplex (com um despareamento) que é então usado para transformar células. O reparo celular dos despareamentos produzirá aproximadamente 50% dos despareamentos que reflete a seqüência coma mudança desejada.

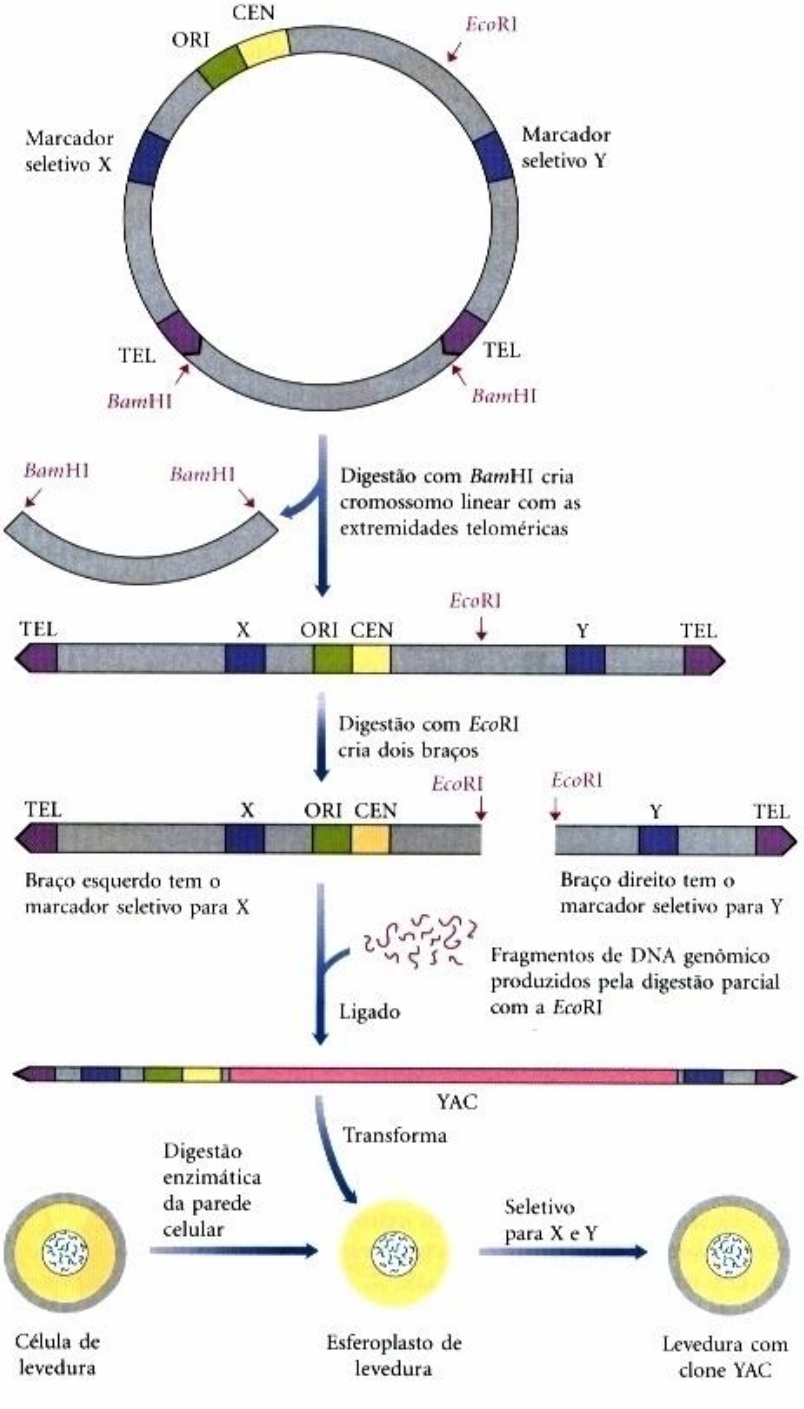

CEN
ORI
EcoRI
Marcador seletivo X
Marcador seletivo Y
TEL
TEL
BamHI
BamHI
BamHI
BamHI
Digestão com BamHI cria cromossomo linear com as extremidades teloméricas
EcoRI
TEL
X
ORI CEN
Y
TEL
Digestão com EcoRI cria dois braços
EcoRI
EcoRI
TEL
X
ORI CEN
Y
TEL
Braço esquerdo tem o marcador seletivo para X
Braço direito tem o marcador seletivo para Y
Fragmentos de DNA genômico produzidos pela digestão parcial com a EcoRI
Ligado
YAC
Transforma
Digestão enzimática da parede celular
Seletivo para X e Y
Célula de levedura
Esferoplasto de levedura
Levedura com clone YAC

Figura 29-16 – Construção de um cromossomo artificial de levedura (YAC). Um vetor YAC inclui uma origem de replicação (ORI), um centrômero (CEN), dois telômeros (TEL) e marcadores seletivos (X e Y). A digestão simultânea com *Bam*H1 e *Eco*RI produz dois braços de DNA separados, cada um com uma extremidade telomérica e um marcador seletivo. Um grande segmento de DNA (por exemplo, 2×10^6 pares de bases do genoma humano) pode ser ligado aos braços para criar um cromossomo artificial de levedura. O YAC pode ser usado para transformar células de levedura preparadas, as quais são selecionadas para X e Y. As células de levedura sobreviventes propagam pelo DNA inserido.

2 milhões de pares de bases) são misturados com os braços preparados do vetor e ligados. A mistura de ligação é então usada para transformar células de levedura preparadas para grandes moléculas de DNA. O cultivo no meio requer a presença de ambos os genes para os marcadores selecionáveis, os quais asseguram que as células de levedura crescerão somente se elas possuírem um cromossomo artificial com um grande inserto entre os dois braços do vetor (Fig. 29-16). A estabilidade dos clones YACs aumentam com o tamanho até um certo ponto. Aqueles com insertos maiores do que 150.000 pares de bases estão próximos da estabilidade como um cromossomo celular normal, enquanto aqueles com insertos menores do que 100.000 pares de bases são gradualmente perdidos durante a mitose (sendo assim, células de levedura, carregando clones formados somente pela ligação das extremidades dos vetores entre si ou com curtos insertos, não são geralmente encontradas). YACs, em que falta um telômero em qualquer lado, são rapidamente degradados.

Bibliotecas de DNA e clones YAC são largamente utilizados para o estudo de grandes genomas. Eles têm particular importância no esforço para seqüenciar completamente o genoma humano e um esforço associado para isolar genes envolvidos com muitas doenças humanas (Adendo 29-2).

Adendo 29-2 O genoma humano e a terapia gênica humana

Em alguma época, num futuro não muito distante, um paciente humano será diagnosticado com deficiência de adenosina desaminase, uma condição genética deletéria que afeta o sistema imune. O tratamento será a inoculação com um variante do HIV (o vírus que causa a AIDS) geneticamente modificado no qual os genes responsáveis pela sua própria reprodução foram inativados. Essa modificação o tornará completamente benigno, restando da sua origem HIV somente a capa protéica.

Uma vez na corrente sangüínea, a capa protéica servirá como alvo para a captação do vírus modificado, pelas células do sistema imune, em que a capa será a vertente para expor uma molécula de DNA recombinante com gene funcional para adenosina desaminase. Um eficiente sistema de empacotamento na recombinação genética na partícula do vírus modificado integrará esse DNA numa localização específica do cromossomo, sem alterar nenhuma outra função celular. Um promotor poderoso comandará a expressão do gene integrado, restaurando a função normal do sistema imune. Uma doença genética será curada.

Este cenário, ou um outro muito semelhante, é destinado a tornar-se parte do dia-a-dia na medicina.

A primeira tentativa de terapia genética humana foi realizada no Instituto Nacional de Saúde em Bethesda, Maryland (CA), em 1990. A paciente era uma menina com quatro anos de idade, cujo sistema imune estava seriamente comprometido pela deficiência da adenosina desaminase usada em nosso exemplo fictício. Essa condição humana rara foi escolhida como alvo para as iniciativas precoces porque ela reunia alguns critérios importantes. O defeito genético é bem caracterizado e, em princípio, podia ser resolvido corrigindo um simples gene. O gene funcional pode operar mesmo na presença do gene defeituoso, assim não é necessário eliminá-lo mais tarde. Finalmente, e mais importante, os efeitos da doença eram suficientemente graves e os riscos consideráveis e inerentes em uma nova tecnologia foram sobrepujados pelo potencial de cura.

Na tentativa de 1990, como em muitos outras subseqüentes, as células da medula óssea foram removidas da paciente e transformadas em laboratório com um retrovírus modificado contendo um gene funcional para a adenosina desaminase, e, a seguir, reintroduzida na medula da paciente. Quatro anos mais tarde, a criança estava levando uma vida aparentemente normal, indo à escola e até mesmo testemunhando, no Congresso, suas experiências anteriores. Apesar desse aparente sucesso, resultados positivos foram indefinidos e mesmo os ensaios de adenosina desaminase não foram decisivos. As crianças que receberam terapia gênica para essa condição estão também recebendo injeções regulares de adenosina desaminase sintética, não deixando claro qual o tratamento é responsável pelos resultados clínicos positivos.

As tentativas continuam, utilizando protocolos mais imaginativos para o tratamento de novas condições e encorajando o desenvolvimento de uma nova indústria de biotecnologia dedicada à terapia gênica humana. Os diversos obstáculos restantes para tornar a terapia gênica um procedimento de rotina estão sendo endereçados aos avanços tecnológicos, mesmo outras doenças são identificadas, as quais, em princípio, podem ser tratadas com essas técnicas emergentes. Os genes envolvidos em muitas doenças humanas já estão sendo rastreados, incluindo aqueles responsáveis pela doença de Huntington, fibrose cística, hipercolesterolemia familiar e várias condições genéticas, as quais conferem uma predisposição hereditária ao câncer (veja Adendo 25-1). A maior máquina para o progresso está surgindo com o projeto do genoma humano. A maior máquina para o progresso surge com o conhecimento do genoma humano e por programas de seqüenciamento de genomas de muitos outros organismos de interesse para a pesquisa e comunidades médicas.

Um obstáculo formidável para a terapia gênica é a eficiente entrega do DNA para as células afetadas. Os vetores retrovirais podem introduzir o DNA nas células eficientemente, mas esse DNA alcança e integra ao cromossomo da célula hospedeira somente quanto o envelope nuclear é transitoriamente desfeito durante a divisão celular. As células que pouco ou nada dividem, tais como os neurônios e as células do músculo esquelético, não podem ser transformadas facilmente por esses vetores. Além disso, os vetores retrovirais inevitavelmente introduzem DNA para muitos tipos celulares que apresentam divisão regular, mas não são alvos apropriados para a terapia e, desde que o DNA seja integrado em locais aleatórios no cromossomo hospedeiro, existe a possibilidade de que algum gene crítico possa ser obstruído. Esses fatores limitam a estratégia para a administração dos vírus modificados diretamente no paciente, o oposto ao processo de transformar as células *in vitro* e então retorná-las ao indivíduo em tratamento. Entretanto, alguns vetores podem ser direcionados para tecidos particulares por meio das proteínas da cobertura viral, as quais são ligadas somente nos receptores das células-alvo.

Estão sendo desenvolvidas alternativas aos vetores do tipo retrovírus. Adenovírus modificados podem suportar grandes segmentos de DNA recombinante, mas faltam neles um sistema de recombinação para integrar o seu DNA no genoma. Além disso, os genes introduzidos tendem a ser expressos somente transitoriamente. Isso pode ser útil quando a proteína a ser expressa, tal como a proteína do envelope de uma bactéria patôgenica, é necessariamente expressa transitoriamente para induzir uma forte resposta imune ao patógeno. Infelizmente, os adenovírus, algumas vezes, induzem uma forte resposta imune que pode romper a eficácia de trata-

Continua na página seguinte

mentos repetidos. São também necessários métodos para encaminhar os adenovírus aos tecidos particulares. Os lipossomos sintéticos não apresentam capacidade inerente para causar doença, mas eles são menos eficientes do que os vírus em transferir DNA recombinante para as células. A escala de opções para a terapia gênica crescerá assim que novos vírus com propriedades úteis são investigados e também com a melhora na tecnologia dos lipossomos. Avanços no entendimento da recombinação genética e expressão gênica também aumentarão a estratégia de vetores.

A terapia gênica não está limitada às doenças genéticas. O tratamento pode ser direcionado para células cancerosas, delineando genes para proteínas que podem destruir a célula ou restaurar o controle normal da divisão celular. As células do sistema imune associadas aos tumores, chamadas de linfócitos infiltradores de tumores, podem ser geneticamente modificadas para produzir fator de necrose tumoral (TNF, veja pág. 372). Quando esses linfócitos são retirados do paciente com câncer, modificados e, a seguir, reintroduzidos, as células geneticamente modificadas para atingir o tumor e produzir o fator de necrose tumoral facilitarão a redução tumoral. A AIDS pode também ser potencialmente tratada com a terapia gênica; um DNA que codifica uma molécula de RNA complementar ao mRNA vital para o HIV pode ser introduzido para as células do sistema imune (o alvo para o HIV). Esse RNA será transcrito a partir do DNA introduzido e irá formar um par com o mRNA do HIV, impedindo a sua translação e interferindo com o ciclo de vida do vírus. Alternativamente, um gene pode ser introduzido codificando uma forma inativa de uma multissubunidade da enzima do HIV; a enzima inteira pode ser inativada se uma subunidade não for funcional. O crescimento no entendimento do genoma humano e as bases genéticas de algumas doenças trazem promessas para um diagnóstico precoce e uma intervenção construtiva. Novas dificuldades éticas também surgem. Existem testes para uma larga escala de condições genéticas, as quais podem predizer nossa saúde futura, e os resultados, muitas vezes, mostram a inexistência de efetivos protocolos de tratamento para responder com segurança à informação obtida. Salvaguardas adequadas são necessárias para proteger contra a discriminação genética no acesso ao seguro ou ao emprego. O avanço dessa tecnologia coloca responsabilidade crescente sobre ambos, indivíduos e a sociedade, como um todo, para encontrar caminhos para proteger a privacidade dos indivíduos e para evitar o estabelecimento de uma subclasse genética de indivíduos conhecidos como portadores de atributos genéticos potencialmente indesejáveis.

A clonagem nas plantas é ajudada por um parasita bacteriano de planta

A introdução de DNA recombinante nas plantas tem enorme implicações para a agricultura, tornando possível alterar os perfis nutricionais ou rendimento das safras ou sua resistência a estresses ambientais, como pragas de insetos, doenças, frio, salinidade e seca. Plantas férteis de algumas espécies podem ser geradas a partir de uma única célula transformada, permitindo que um gene introduzido possa ser transmitido à progênie por meio da semente.

Nenhum plasmídio, de ocorrência natural, em células de plantas, foi encontrado para facilitar a clonagem em plantas; portanto, o maior desafio técnico é introduzir o DNA nas células das plantas. Um aliado importante e adaptável a esse esforço é a bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens.* Essa bactéria pode invadir as plantas no local de uma ferida, transformando as células próximas e as induzindo a formar um tumor chamado de coroa de *galha.* O *Agrobacterium* contém um plasmídio grande (~200.000 pares de bases), chamado de plasmídio Ti (Fig. 29-17a). Quando a bactéria entra em contato com uma célula da planta danificada, um segmento do plasmídio Ti, com 23.000 pares de bases chamado de DNA T, é transferido do plasmídio e integrado numa posição aleatória num dos cromossomos da planta. A transferência do DNA T da *Agrobacterium* para o cromossomo da célula da planta libera duas repetições de 25 pares de bases que flanqueiam o DNA T e os produtos dos genes de virulência (*vir*), também sobre o plasmídio Ti (Fig. 29-17a).

O DNA T codifica enzimas que convertem os metabólitos de plantas em duas classes de compostos que beneficiam a bactéria (Fig. 29-18). A primeira classe consiste dos hormônios de crescimento das plantas (auxinas e citocininas), que estimulam o crescimento das células das plantas transformadas, para formar o tumor coroa de galha. A segunda classe gera uma série de aminoácidos não usuais chamados de opinas, os quais servem como uma fonte de alimento para a bactéria. As opinas são produzidas em altas concentrações nas células tumorais e secretadas na circunvizinhança, onde elas podem ser metabolizadas pelo *Agrobacterium,* usando enzimas codificadas em outro lugar no plasmídio Ti. Dessa maneira, a bactéria monopoliza os nutrientes disponíveis, convertendo-os numa forma que beneficia somente ela própria.

Esse exemplo raro de transferir DNA de um procarioto para um eucarioto é um processo natural da engenharia genética, o qual pode ser utilizado para transferir DNA recombinante (no lugar do DNA T) para o genoma da planta. Uma estratégia de clonagem comum emprega um *Agrobacterium* que tenha dois

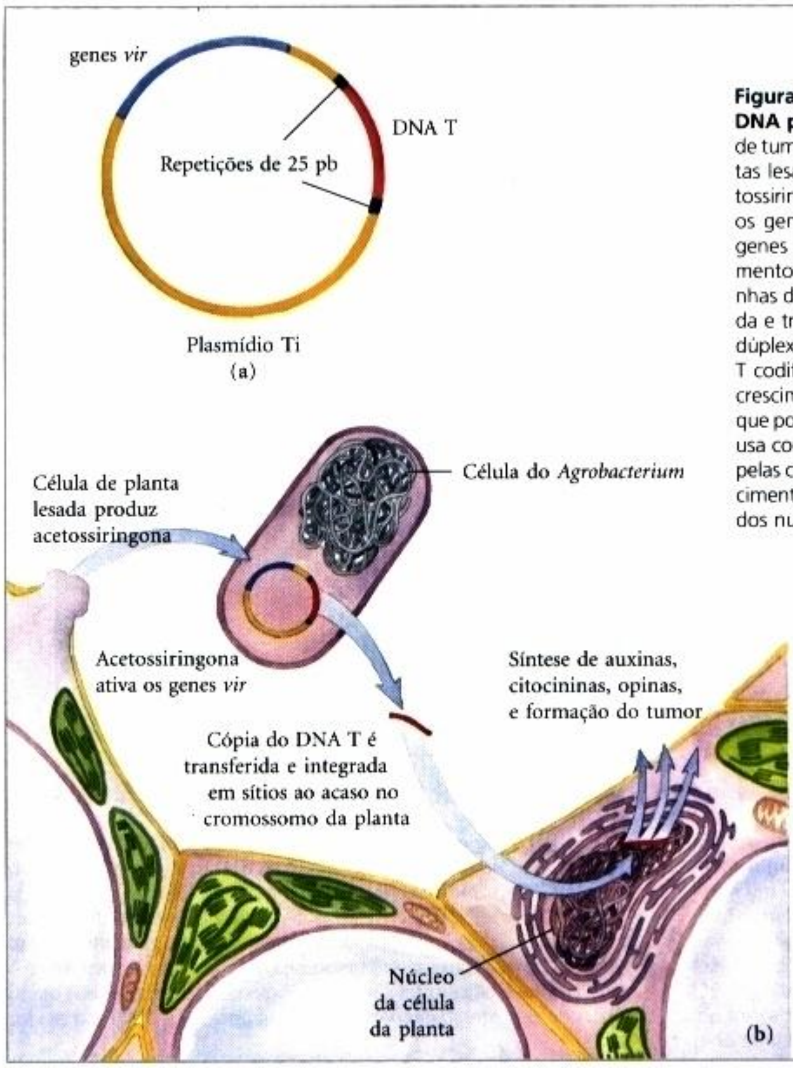

genes *vir*
DNA T
Repetições de 25 pb
Plasmídio Ti
(a)
Célula de planta lesada produz acetossiringona
Célula do *Agrobacterium*
Acetossiringona ativa os genes *vir*
Síntese de auxinas, citocininas, opinas, e formação do tumor
Cópia do DNA T é transferida e integrada em sítios ao acaso no cromossomo da planta
Núcleo da célula da planta
(b)

Figura 29-17 – Uma bactéria parasita de plantas transfere DNA para as células das plantas. (**a**) O plasmídio Ti (indutor de tumor) do *Agrobacterium tumefaciens*. (**b**) As células de plantas lesadas produzem e liberam um composto fenólico, a acetossiringona. Quando o *Agrobacterium* detecta esse composto, os genes da virulência (*vir*) no plasmídio Ti são expressos. Os genes *vir* codificam enzimas necessárias para introduzir o segmento do DNA T do plasmídio Ti no genoma das células vizinhas da planta. Uma cópia de fita simples do DNA T é sintetizada e transferida à célula da planta, onde é convertida em DNA dúplex e integrada no cromossomo da célula da planta. O DNA T codifica enzimas que sintetizam não somente hormônios de crescimento, mas também opinas (veja Fig. 29-18), compostos que podem ser metabolizadas apenas pelo *Agrobacterium*, o qual usa como fonte de nutrientes. A expressão dos genes do DNA T pelas células das plantas transformadas leva a um aberrante crescimento da célula da planta (formação do tumor) e ao desvio dos nutrientes da célula da planta para a bactéria invasora.

plasmídios recombinantes diferentes. O primeiro é um plasmídio Ti do qual se removeu, no laboratório o segmento DNA T (Fig. 29-19a). O segundo é um vetor ida-e-volta, *Agrobacterium-E. coli*, que contenha as repetições de 25 pares de bases do DNA T flanqueando o gene que o pesquisador deseja introduzir na célula da planta e um marcador de seleção como a resistência à canamicina (Fig. 29-19b). O *Agrobacterium* construído é usado para infectar uma folha, mas as coroas de galhas não são formadas pelo fato de os genes da auxina, citocina e as enzimas biossintetizantes das opinas não estarem presentes em nenhum dos plasmídios. Em vez disso, os produtos do gene *vir* do plasmídio Ti alterado direcionam a transformação das células da planta pelo gene flanqueado pelas repetições de 25 pares de bases do DNA T no segundo plasmídio. As células transformadas podem ser selecionadas pelo crescimento sobre placas de ágar contendo canamicina e induzidas com hormônios de crescimento para formar novas plantas contendo o gene estranho em cada célula.

O sucesso da transferência do DNA recombinante nas plantas é ilustrado vivamente por um experimento em que o gene da luciferase de vaga-lumes foi introduzido numa planta de tabaco (Fig. 29-20), o qual é, muitas vezes, usado experimentalmente porque suas células são particularmente fáceis de ser transformadas com o *Agrobacterium*. O potencial dessa tecnologia não é limitado à produção de plantas que brilham no escuro. A mesma abordagem tem sido usada para produzir plantas que sejam resistentes a herbicidas, vírus de plantas e pragas de insetos (Fig. 29-21). Os benefícios potenciais incluem o aumento na produção e uma redução na necessidade de produtos químicos usados na agricultura que são ambientalmente perigosos.

A biotecnologia pode introduzir novas características nas plantas muito mais rápido do que os métodos tradicionais de criação de plantas. Um exemplo proeminente é o desenvolvimento de feijões de soja que são resistentes ao herbicida geral glifosato (o ingrediente ativo do RoundUp). O glifosato é rapidamente degradado no ambiente (plantas sensíveis podem ser plantadas numa área tratada após o intervalo de 48 horas), e seu uso geralmente não leva à contaminação dos canais de irrigação de um ano ao próximo. A área desses feijões de soja pode ser tratada uma vez durante a estação de crescimento no verão, para eliminar essencialmente todas as ervas daninhas no campo, mantendo os feijões de soja inalterados (Fig. 29-22). Dificuldades potenciais da tecnologia, tais como a evolução de ervas daninhas resistentes ao glifosato ou o escape de plantas recombinantes de difícil controle, permanecem como preocupação para os pesquisadores e para a população.

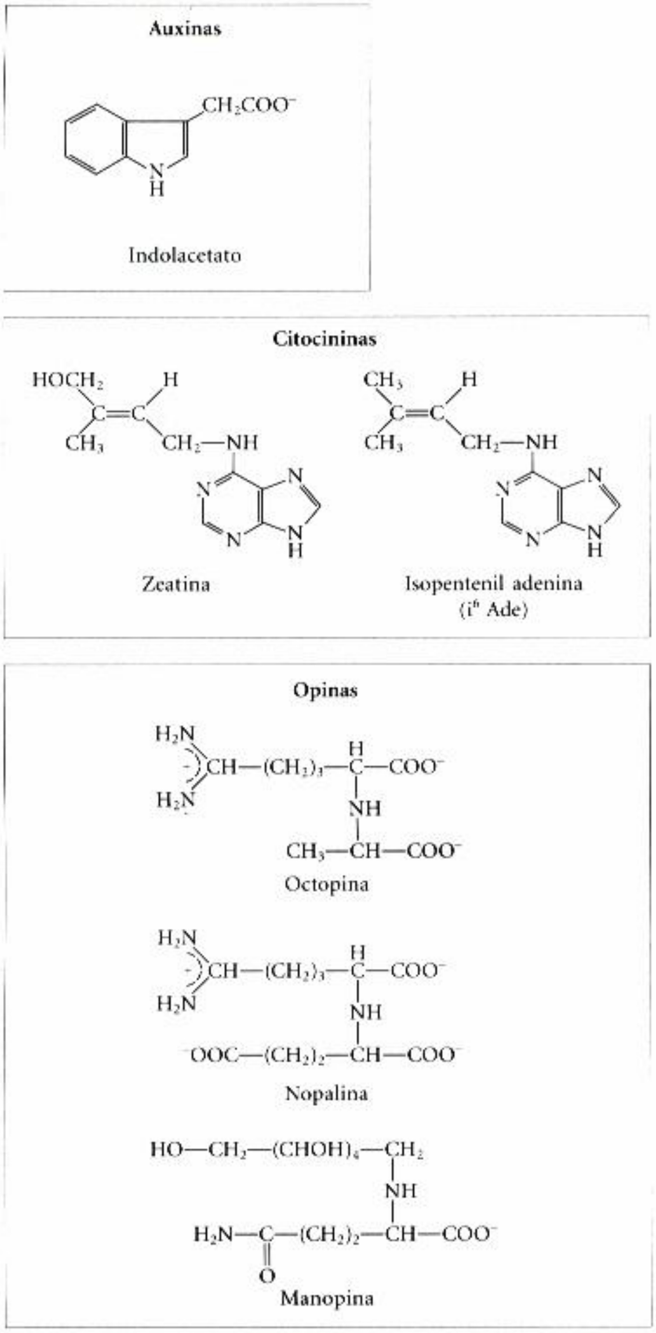

Auxinas
Indolacetato
Citocininas
Zeatina
Isopentenil adenina (i⁶ Ade)
Opinas
Octopina
Nopalina
Manopina

Figura 29-18 – Metabólitos produzidos em células de plantas infectadas com o *Agrobacterium*. Auxinas e citocininas são hormônios de crescimento de plantas. A auxina mais comum é o indolacetato, derivado do triptofano. Citocininas são derivadas da adenina. As opinas geralmente são derivadas de aminoácidos precursores, pelo menos 14 opinas diferentes foram identificadas nas diferentes espécies do *Agrobacterium*.

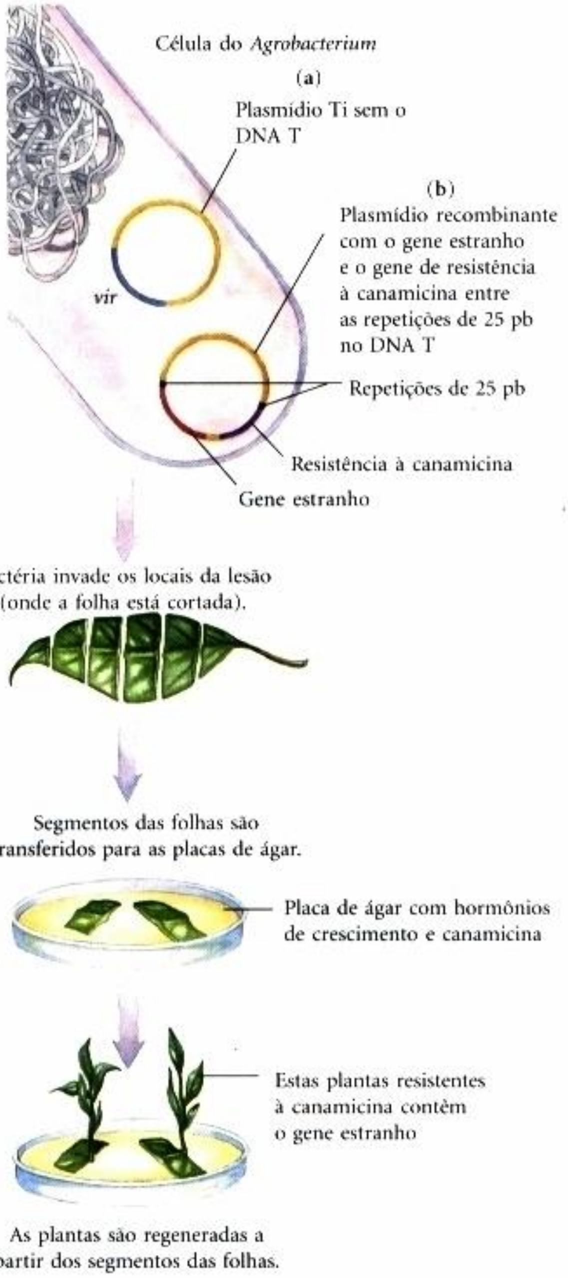

Célula do Agrobacterium
(a)
Plasmídio Ti sem o DNA T
vir
(b)
Plasmídio recombinante com o gene estranho e o gene de resistência à canamicina entre as repetições de 25 pb no DNA T
Repetições de 25 pb
Resistência à canamicina
Gene estranho
Bactéria invade os locais da lesão (onde a folha está cortada).
Segmentos das folhas são transferidos para as placas de ágar.
Placa de ágar com hormônios de crescimento e canamicina
Estas plantas resistentes à canamicina contêm o gene estranho
As plantas são regeneradas a partir dos segmentos das folhas.

Figura 29-19 – Uma estratégia com dois plasmídios para criar uma planta recombinante. (**a**) Um dos plasmídios é o plasmídio Ti modificado de forma tal que não possua o DNA T. (**b**) O outro plasmídio não possui os usuais genes do DNA T, mas contém um segmento de DNA que contém o gene de interesse (por exemplo, o gene para a proteína que mata insetos, descrito na Fig. 29-21) e um elemento de resistência ao antibiótico (aqui, resistência à canamicina) flanqueado pelos 25 pares de bases de repetição do DNA T. O segundo plasmídio também contém a origem de replicação necessária à propagação no *Agrobacterium*. Quando a bactéria invade os locais da ferida (a margem da folha cortada). Os genes *vir* no primeiro plasmídio medeiam a transferência para o genoma da planta do segmento do segundo plasmídio flanqueado pelas repetições de 25 pares de bases. Novas plantas são geradas quando segmentos das folhas com as células transformadas são colocadas numa placa de ágar com níveis controlados dos hormônios de plantas e canamicina. As células das plantas não transformadas são mortas pela canamicina. O gene de interesse e o elemento de resistência ao antibiótico são normalmente transferidos juntos e, portanto, as plantas que crescem nesse meio geralmente contêm o gene de interesse.

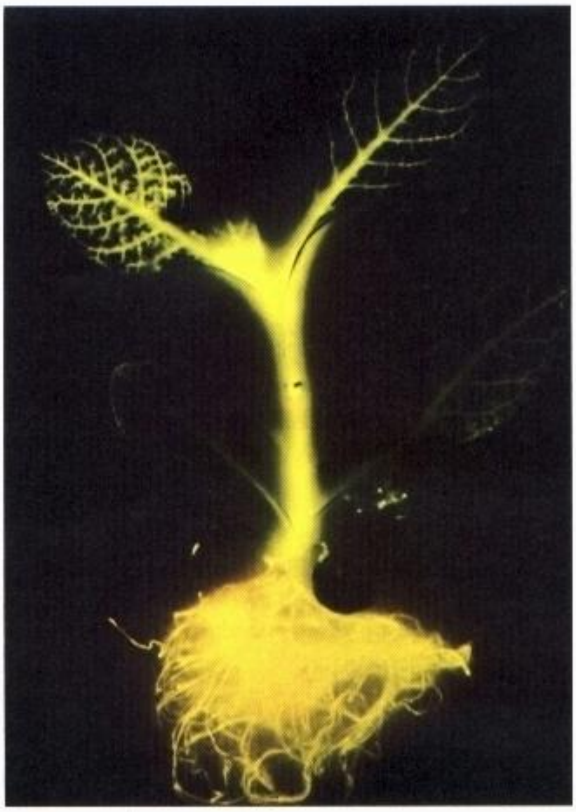


Figura 29-20 – **Uma planta de tabaco na qual o gene da luciferase do vaga-lume é expresso**. A luz foi produzida depois que a planta foi aguada com uma solução contendo luciferina, o substrato para essa enzima produtora de luz (veja Adendo 14-3). Não espere plantas ornamentais que brilhem no escuro na sua floricultura local tão cedo; a luz de fato é muito fraca e esta fotografia representa uma exposição de 24 horas. O ponto real — que essa tecnologia permite a introdução de novas características nas plantas — está, entretanto, elegantemente demonstrado.

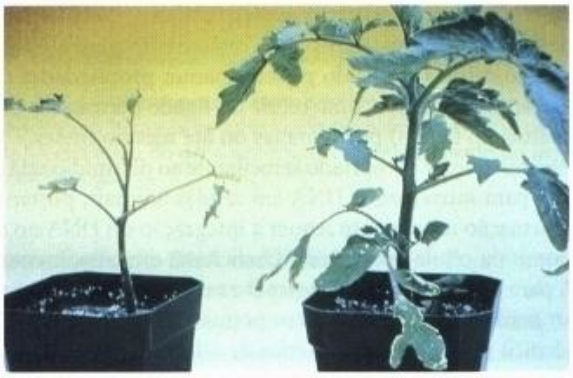
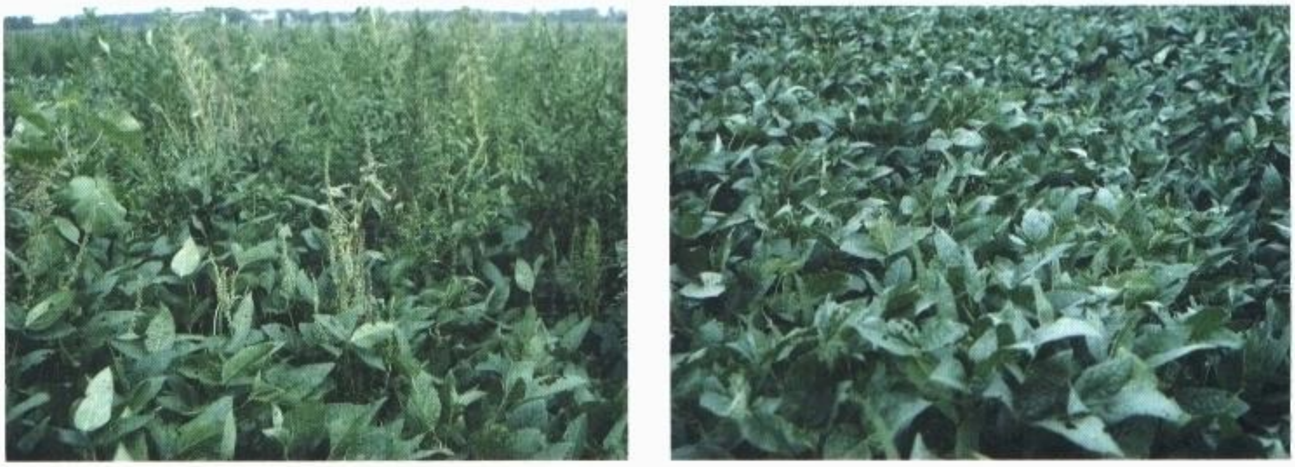
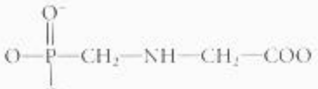


Figura 29-21 – **Plantas de tomate idealizadas para serem resistentes a algumas larvas de insetos**. Duas plantas de tomate foram expostas a um igual número de larvas de mariposas. A planta à esquerda não está geneticamente alterada. A planta à direita expressa um gene para uma proteína tóxica, derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis*. A proteína, introduzida por um protocolo, semelhante àquele descrito na Figura 29-19, é tóxica para a larva de algumas espécies de mariposas, não sendo tóxica para o homem e outros organismos. A resistência a insetos tem sido também geneticamente construída em algodão e outras plantas.



(a)

(b)



$$O-\underset{\underset{O^-}{|}}{\overset{\overset{O^-}{\|}}{P}}-CH_2-NH-CH_2-COO$$

Glifosato

(c)

Figura 29-22 – **Pés de feijão de soja resistentes ao glifosato crescendo num campo em Wisconsin**. (**a**) Sem o tratamento com o glifosato, essa parte da plantação do feijão de soja está coberta de ervas daninhas. (**b**) Plantas de feijão de soja resistentes ao glifosato crescem numa área tratada com o glifosato. (**c**) O glifosato degrada-se rapidamente no ambiente. O uso de plantas modificadas, na agricultura, com considerável deliberação, balanceia a extraordinária promessa da tecnologia com a necessidade cuidadosa de selecionar novas características. Ambas, a ciência e a sociedade, como um todo, têm interesse em assegurar que o uso dessas plantas não tenha impacto adverso sobre o ambiente ou à saúde humana.

A clonagem nas células animais aponta o caminho para a terapia gênica humana

A transformação das células animais com material genético estranho oferece um mecanismo importante para o avanço no conhecimento sobre a estrutura e a função dos genomas animais, bem como para a geração de animais com novas características. Esse potencial tem gerado intensos esforços de pesquisa que têm produzido meios crescentemente sofisticados para a clonagem nos animais.

A maioria dos trabalhos dessa espécie requer uma fonte de células para a qual o DNA possa ser introduzido. Embora tecidos intactos sejam freqüentemente difíceis de ser manipulados e mantidos *in vitro*, muitos tipos de células animais podem ser isolados e crescer no laboratório se os seus requerimentos de crescimento forem cuidadosamente atendidos. Células derivadas de um tecido animal particular e crescem sob condições apropriadas de **cultura de tecido** podem manter propriedades diferenciadas (por exemplo, uma célula do fígado permanece como uma célula do fígado) por semanas ou até mesmo meses.

Nenhum vetor apropriado semelhante ao plasmídio está disponível para introduzir o DNA em células animais, portanto a transformação usualmente requer a integração do DNA no cromossomo da célula hospedeira. O eficiente direcionamento do DNA para o núcleo e a sua integração no cromossomo sem perturbar nenhum dos genes críticos permanecem o maior problema técnico na engenharia genética de células animais.

Os métodos disponíveis para levar o DNA ao interior da célula variam em eficiência e conveniência. Algum sucesso foi encontrado usando captação espontânea do DNA ou a eletroporação, técnicas que são grosseiramente comparáveis aos métodos comuns usados para transformar bactéria. Todavia, eles são ineficientes, apenas cerca de uma em 10^2 a 10^4 células é transformada por esse procedimento. A **microinjeção** acarreta a injeção direta do DNA no núcleo de uma célula com a ajuda de uma agulha muito fina. Para os praticantes hábeis, esse método possui uma alta taxa de sucesso, mas, pelo fato de as células precisarem ser injetadas uma a uma, o número total que pode ser tratado é pequeno.

Os métodos mais eficientes e largamente usados para transformar células animais utilizam os lipossomos ou vetores virais. Os lipossomos são pequenas vesículas que consistem em uma bicamada de lipídios que mantém um compartimento aquoso (veja Fig. 12-4). Os lipossomos que mantêm uma molécula de DNA recombinante podem ser fundidos com as membranas das células-alvo para direcionar o DNA para o interior da célula. O DNA, algumas vezes, alcança o núcleo onde ele pode ser integrado no cromossomo (a maioria em localizações aleatórias). **Vetores virais** são mais eficientes para introduzir DNA. Vírus de animal tem desenvolvido mecanismos efetivos para introduzir seus ácidos nucléicos no interior das células e vários tipos também possuem mecanismos para integrar o seu DNA no cromossomo da célula hospedeira. Alguns desses, tais como os retrovírus (pág. 794) e adenovírus, foram modificados para atuar como vetores virais na introdução de DNA estranho em células de mamíferos.

O trabalho com vetores retrovirais ilustra um tipo de estratégia em uso (Fig. 29-23). Quando o retrovírus modificado entra na célula, o seu genoma de RNA é convertido em DNA pela transcriptase reversa e então é integrado num genoma hospedeiro numa reação mediada pela integrase viral. As seqüências de terminais de repetição (LTR) são necessárias para a integração do DNA retroviral no cromossomo hospedeiro (veja Fig. 26-32) e a seqüência ψ é necessária para empacotar o RNA viral nas partículas virais.

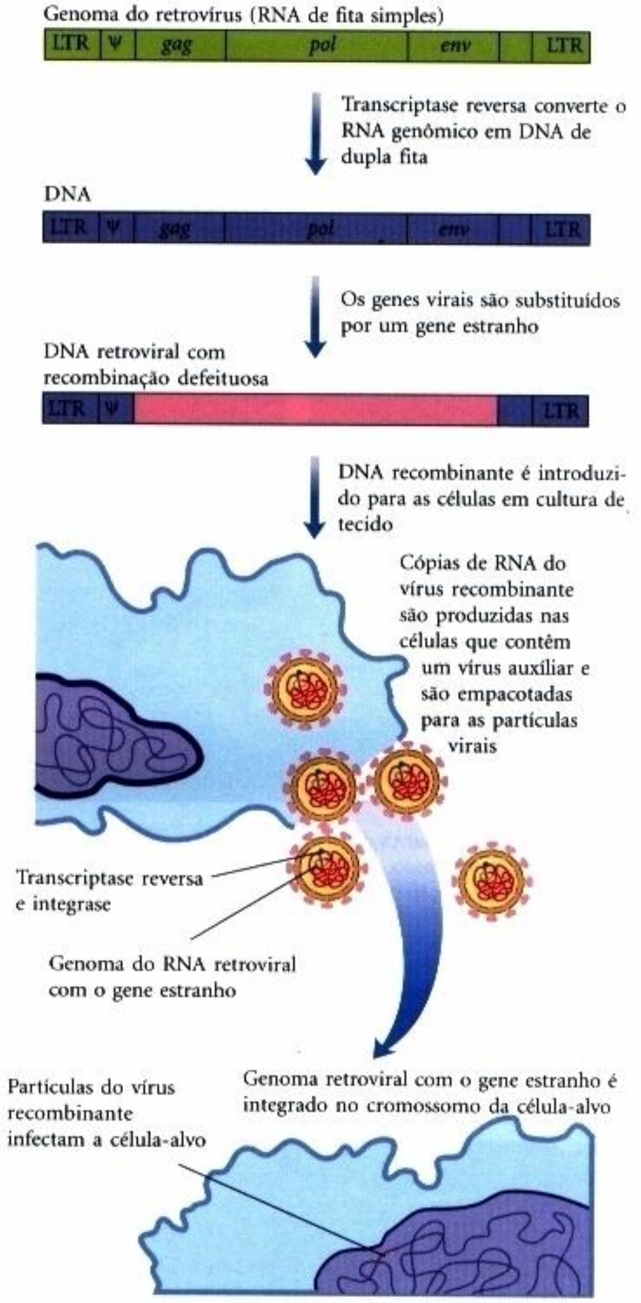

Genoma do retrovírus (RNA de fita simples)
LTR
ψ
gag
pol
env
LTR
Transcriptase reversa converte o RNA genômico em DNA de dupla fita
DNA
LTR
ψ
gag
pol
env
LTR
Os genes virais são substituídos por um gene estranho
DNA retroviral com recombinação defeituosa
LTR
ψ
LTR
DNA recombinante é introduzido para as células em cultura de tecido
Cópias de RNA do vírus recombinante são produzidas nas células que contêm um vírus auxiliar e são empacotadas para as partículas virais
Transcriptase reversa e integrase
Genoma do RNA retroviral com o gene estranho
Partículas do vírus recombinante infectam a célula-alvo
Genoma retroviral com o gene estranho é integrado no cromossomo da célula-alvo

Figura 29-23 – Clonagem em células de mamíferos com vetores retrovirais. Um genoma retroviral típico (aqui simplificado) é delineado para conter um gene estranho de interesse e direcioná-lo para uma célula hospedeira em cultura de tecido. O vírus auxiliar (não mostrado) não contém a seqüência de empacotamento ψ, desse modo, o seu RNA transcrito não pode ser empacotado para as partículas virais. No entanto, ele possui os genes *gag*, *pol* e *env*, cujos produtos são necessários para o empacotamento do retrovírus modificado para partículas de vírus funcionais, permitindo que o gene estranho situado no genoma do retrovírus recombinante seja eficientemente introduzido nas células-alvo.

Os genes *gag*, *pol* e *env* do genoma retroviral, necessários para a replicação e montagem das partículas virais, podem ser substituídos por DNA estranho. Para montar os vírus com a informação genética recombinante, o DNA deve ser introduzido nas células da cultura de tecido que estão infectadas com um vírus auxiliar que possui os genes para produzir as partículas virais, mas não possui a seqüência ψ necessária para o empacotamento. Isso permite ao DNA recombinante ser transcrito e o seu RNA ser empacotado nas partículas virais. Essas partículas podem agir como vetores para introduzir este RNA nas células-alvo. As enzimas transcriptase reversa e integrase virais (produzidas pelo vírus auxiliar) são também empacotadas nas partículas virais e introduzidas nas células-alvo. Assim que o genoma viral construído estiver dentro de uma célula, essas enzimas criam uma cópia de DNA do genoma RNA viral e a integram num cromossomo hospedeiro. O DNA recombinante integrado torna-se, efetivamente, uma parte permanente do cromossomo e é replicado com o cromossomo a cada divisão celular. A própria célula não sofre alteração pela integração do DNA viral porque o vírus recombinante não possui os genes necessários para produzir cópias de RNA a partir do seu genoma e empacotá-los em novas partículas virais. Na maioria dos casos, o uso dos retrovírus recombinantes é o melhor método para introduzir DNA num grande número de células de mamíferos.

Cada tipo de vírus tem diferentes atributos, sendo assim, várias classes de vírus animal estão sendo modificadas como vetores para transformar células de mamíferos. Nos adenovírus, por exemplo, falta um mecanismo para integrar o DNA no cromossomo. O DNA recombinante introduzido via um vetor de adenovírus é, no entanto, expresso por um curto período de tempo e a seguir destruído. Isso pode ser útil se o objetivo for a expressão transitória de um gene.

A transformação das células animais, por qualquer das técnicas descritas, é problemática por várias razões. O DNA estranho é geralmente inserido em localizações cromossômicas que variam aleatoriamente. Quando o DNA estranho contiver uma seqüência homóloga a uma seqüência no cromossomo hospedeiro, permitindo orientação para a posição de integrantes não homólogos, ainda excede os orientados de 100 a 100.000 vezes. Se esses eventos de integração alterarem genes essenciais, eles podem matar a célula. Sítios de integração podem também determinar o nível de expressão de um gene integrado, pelo fato de genes integrados não serem igualmente bem transcritos em qualquer lugar do genoma.

A despeito desses desafios, a transformação de células animais tem sido usada extensivamente para estudar a estrutura do cromossomo, bem como a função, regulação e expressão dos genes nas células animais. A introdução com sucesso do DNA recombinante numa célula animal pode ser ilustrada por um experimento que permanentemente alterou uma característica física hereditária facilmente observável.

A microinjeção de DNA, no núcleo de ovos de camundongos fertilizados, pode produzir transformação eficiente (integração cromossômica). Quando os ovos injetados são introduzidos em camundongo fêmea e permitindo-se o desenvolvimento, o novo gene é freqüentemente expresso em alguns dos camundongos recém-nascidos. Aqueles em que a linha germinativa foi alterada podem ser identificados testando sua descendência. Por reprodução cuidadosa, uma linhagem de camundongo **transgênicos** pode ser estabelecida onde todos os camundongos sejam homozigotos para o novo gene ou genes. Essa tecnologia foi usada para introduzir, em camundongos, o gene do hormônio de crescimento humano sob o controle de um promotor induzível. Quando os camundongos foram alimentados com uma dieta que incluía o indutor, alguns dos camundongos que se desenvolveram a partir de embriões injetados cresceram até um tamanho inusitadamente maior (Fig. 29-24). Camundongos transgênicos estão agora sendo produzidos com uma grande escala de variações genéticas, incluindo muitas doenças relevantes para o homem e seus controles, apontando o caminho para a terapia gênica humana (Adendo 29-2).

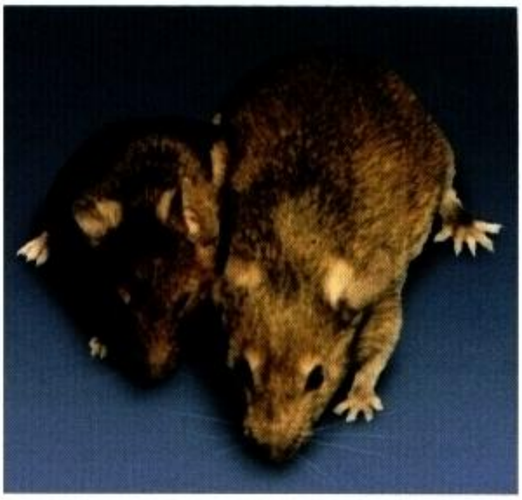


Figura 29-24 – Clonagem em camundongo. O gene para o hormônio de crescimento humano foi introduzido no genoma do camundongo à direita. A expressão do gene resultou em grande aumento do tamanho do camundongo.

A tecnologia do DNA recombinante produz novas escolhas e produtos

Os produtos da tecnologia do DNA recombinante variam das proteínas aos organismos construídos. Grandes quantidades de proteínas comercialmente úteis podem ser produzidas por essas técnicas. Microrganismos podem ser planejados para tarefas especiais; plantas ou animais podem ser construídos com características que sejam úteis para a agricultura ou a medicina. Alguns produtos dessa tecnologia foram aprovados para o consumidor ou uso profissional e muitos outros estão em desenvolvimento. Durante poucos anos, a engenharia genética foi transformada de tecnologia promissora em uma indústria de muitos bilhões de dólares. Muito desse crescimento veio da indústria farmacêutica. Algumas das principais classes dos novos produtos estão listadas na Tabela 29-3.

A eritropoetina é típica dos novos produtos. A eritropoetina é um hormônio protéico (M_r 51.000) que estimula a produção dos eritrócitos. Pessoas com doença renal freqüentemente possuem uma deficiência dessa proteína, uma condição que leva à anemia. A eritropoetina produzida pela tecnologia do DNA recombinante pode ser usada para tratar esses pacientes, reduzindo a necessidade de transfusões sangüíneas repetidas.

Outras aplicações industriais dessa tecnologia parece que continuarão a se desenvolver. As enzimas produzidas pela tecnologia do DNA recombinante já estão sendo usadas para produzir detergentes, açúcares e queijos. Proteínas construídas estão sendo usadas como aditivos para suplementar a nutrição, o sabor e a fragrância. Microrganismos estão sendo construídos com vias metabólicas alteradas ou inteiramente novas para extrair óleo e minerais de depósitos no solo, para digerir óleo de vazamentos e detoxicar resíduos perigosos de depósitos de lixo e esgotos. Plantas construídas com resistência aumentada à estiagem, geada, pragas e doenças aumentam a safra e reduzem a necessidade de produtos químicos usados na agricultura. Animais completos podem ser clonados pela retirada de um núcleo inteiro e todo o seu material genético para um ovo preparado no qual o seu núcleo foi removido. A grande escala de conseqüências a longo prazo dessa tecnologia para nossa espécie e para o ambiente global é impossível de ser prevista, mas certamente ocasionará um melhor entendimento da ecologia e do metabolismo celular.

Tabela 29-3 – Produtos do DNA recombinante na medicina

Categoria do produto	Exemplos/usos
Anticoagulantes	O ativador do plasminogênio tecidual (TPA) ativa a plasmina, uma enzima envolvida na dissolução dos coágulos; efetivo no tratamento das vítimas do infarto cardíaco
Fatores do sangue	O fator VIII promove a coagulação e é deficiente nos hemofílicos. O uso do fator VIII produzido pela tecnologia do DNA recombinante elimina os riscos associados às transfusões sangüíneas
Fatores estimulantes de colônia	Fatores de crescimento do sistema imune que estimulam a produção de leucócitos; usados para tratar deficiências imunes e lutar contra infecções
Eritropoetina	Estimula a produção de eritrócitos; usada para tratar a anemia em pacientes com doenças renais
Fatores de crescimento	Estimulam a diferenciação e o crescimento de vários tipos celulares; usados para promover a cicatrização de feridas
Hormônio de crescimento humano	Usado para tratar a baixa estatura
Insulina humana	Usada para tratar o diabetes
Interferons	Interferem com a reprodução viral; também usados para tratar alguns tipos de câncer
Interleucinas	Ativam e estimulam diferentes classes de leucócitos; usos possíveis na cicatrização de feridas, infecção com o HIV, câncer e deficiências imunes
Anticorpos monoclonais	A extraordinária especificidade de ligação é usada para os testes diagnósticos. Também usados para o transporte de drogas, toxinas ou compostos radioativos, aos tumores na terapia contra o câncer; muitos outros usos
Superóxido dismutase	Previne a lesão tecidual de espécies reativas de oxigênio quando os tecidos, desprovidos de O_2 por períodos curtos durante a cirurgia, bruscamente têm o fluxo sangüíneo restaurado
Vacinas	Proteínas derivadas das capas virais são tão efetivas na "iniciação" da resposta imune quanto nos vírus mortos, tradicionalmente usados nas vacinas, mas são muito mais seguras. A primeira desenvolvida foi a da hepatite B

Resumo

O estudo da estrutura e da função do gene tem sido amplamente facilitado pela tecnologia do DNA recombinante. O isolamento de um gene de um cromossomo grande requer métodos para cortar e unir fragmentos de DNA, disponibilidade de vetores de DNAs pequenos que possam se replicar autonomamente e local onde o gene possa ser inserido, métodos para introduzir o vetor com o seu DNA estranho numa célula em que ele possa se propagar para formar clones e métodos para identificar as células contendo o DNA de interesse. Avanços nessa tecnologia estão revolucionando muitos aspectos da medicina, agricultura e outros industriais.

O primeiro organismo usado para a clonagem do DNA foi a *E. coli.* Endonucleases de restrição bacteriana e DNA ligases fornecem os instrumentos mais importantes para cortar o DNA em seqüências específicas e unir fragmentos de DNA. Os vetores de clonagem bacteriana incluem os plasmídios, bacteriófagos e cromossomo artificial de bactéria (BACs — "bacterial artificial chromosomes"). Estes permitem a clonagem de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Em cada caso, os vetores fornecem uma origem de replicação para a propagação no hospedeiro bacteriano e um elemento genético seletivo (como a resistência ao antibiótico) para facilitar a identificação das células que contenham o vetor recombinante. O DNA é introduzido nas células em vetores virais ou por métodos artificiais que tornam a parede celular permeável.

A primeira etapa na clonagem de um gene é freqüentemente a construção de uma biblioteca de DNA que inclua fragmentos, representando virtualmente a maioria do genoma de uma dada espécie. Um biblioteca de cDNA é limitada para expressar genes pela clonagem de apenas cópias do DNA complementar de mRNAs isolados. Um segmento específico de DNA pode ser amplificado e clonado usando a reação em cadeia da polimerase. Clones, que contêm um gene específico numa grande biblioteca, podem ser detectados pela hibridização com uma sonda radioativa que contenha a seqüência nucleotídica complementar. Microarranjos de DNA fornecem bibliotecas definidas para a investigação do padrão de expressão gênica como um todo.

Vetores de expressão fornecem as seqüências de DNA requeridas para a transcrição, tradução e regulação dos genes clonados. Eles permitem a produção de grandes quantidades de proteínas clonadas para a pesquisa e propósitos comerciais. Genes clonados podem também ser alterados por mutagênese sítio-dirigida, que é útil nos estudos da estrutura e função das proteínas.

A levedura é, algumas vezes, usada para a clonagem de DNA eucariótico e possui muitas das mesmas vantagens da *E. coli.* Vetores YACs permitem a clonagem de DNA com 2×10^6 pares de bases. Clonagem em plantas e animais estão produzindo uma variedade de organismos com características alteradas. Plantas que são resistentes a doenças, insetos, herbicidas e estiagem estão sendo produzidas com a ajuda de um processo de transferência de um gene natural promovida pelo plasmídio Ti da bactéria parasita *Agrobacterium tumefaciens.* O DNA construído pode ser introduzido nas células animais por eletroporação, microinjeção, lipossomos ou vetores retrovirais, resultando em animais com novas características genéticas herdáveis. A tecnologia estende-se aos humanos, e a terapia gênica humana está agora direcionada a tratar as doenças genéticas humanas. As implicações econômicas, sociais e ambientais da tecnologia do DNA recombinante são vastas e profundas.

Leitura Adicional

Geral

Jackson DA, Symons RH, & Berg P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2904-2909.

O primeiro experimento de DNA recombinante unindo DNA de dois organismos diferentes.

Lobban PE & Kaiser AD. (1973) Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **78**, 453-471.

Relato do primeiro experimento do DNA recombinante.

Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Embora suplantado por manuais mais recentes, este conjunto de três volumes inclui informações muito úteis sobre os princípios biológicos, químicos e físicos subjacentes a técnicas clássicas e ainda corrente.

Bibliotecas e isolamento gênico

Arnheim N & Erlich H. (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 131-156.

Audic S & Béraud-Colomb E. (1997) Ancient DNA is thirteen years old. *Nat. Biotech.* **15**, 855-858.

Brown T & Brown K. (1994) Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *Bioessays* **16**, 719-726.

Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holand MM, Weedn VW & Parsons TJ. (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat. Genet.* **12**, 417-420.

Lindahl T. (1997) Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell* **90**, 1-3.

Produtos da tecnologia do DNA recombinante

Bailey JE. (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-1675.

Uma revisão dos esforços para reconstruir vias metabólicas nos organismos para propósitos comerciais.

Blaese RM. (1997) Gene therapy for cancer. *Sci. Am.* **276** (June), 111-115.

Brown PO & Botstein D. (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* **21**, 33-37.

Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L, and the members of the Department of Energy and National Institutes of Health planning groups. (1998) New goals for the US human genome project: 1998-2003. *Science* **282**, 682-689.

Culver KW, Osborne WRA, Miller AD, Fleisher TA, Berger M, Anderson WF, & Blaese RM. (1991) Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplant Proc.* **23**, 170-171.

Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, Difiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangianni L, & Bates GP. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-548.

Terapia gênica na deficiência de adenosina deaminase.

Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, Donnelly P, de Knijff P, Mieremet R, Zerjal T, & Tyler-Smith C. (1999) The Thomas Jefferson paternity case. *Nature* **397**, 32.

Último artigo de uma série de um interessante estudo de caso dos usos da biotecnologia para direcionar questões históricas.

Friedmann T. (1997) Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci. Am.* **276** (June), 96-101.

Hansen G & Wright MS. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* **4**, 226-231.

Hooykaas PJJ & Schilperoort RA. (1985) The Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*: a natural genetic engineer. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 307-309.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, & Lovell-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* **351**, 117-121.

Tecnologia do DNA recombinante é usada para demonstrar que um único gene direciona o desenvolvimento de camundongos cromossomicamente fêmeas em machos.

Lapham EV, Kozma C, & Weiss J. (1996) Genetic discrimination: perspectives of consumers. *Science* **274**, 621-624.

Mahowald MB, Verp MS, & Anderson RR. (1998) Genetic counseling: clinical and ethical challenges. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 547-559.

Marshall E. (1995) Gene therapy's growing pains. *Science* **269**, 1050-1055.

Murray TH. (1991) Ethical issues in human genome research. *FASEB J.* **5**, 55-60.

Este número também contém vários outros trabalhos úteis sobre o projeto do genoma humano.

Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, & Evans RM. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes. *Nature* **300**, 611-615.

Uma descrição de como fazer camundongos gigantes.

Peterson KR, Clegg CH, Li QL, & Stamatoyannopoulos G. (1997) Production of transgenic mice with yeast artificial chromosomes. *Trends Genet.* **13**, 61-66.

Ramsay M. (1994) Yeast artificial chromosome cloning. *Molec. Biotech.* **1**, 181-201.

Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, & Wanker EE. (1997) Huntington-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549-558.

Schuler GD, Boguski MS et al. (1996) A gene map of the human genome. *Science* **274**, 540-546.

Thompson J & Donkersloot JA. (1992) *N*-(Carboxyalkyl) amino acids: occurence, synthesis, and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 517-557.

Um bom resumo das funções biológicas e estruturais das opinas.

Verma I & Somia N. (1997) Gene therapy—promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239-242.

Problemas

1. **Clonagem**. Quando se juntam dois ou mais fragmentos de DNA, um pesquisador pode ajustar a seqüência na junção em uma variedade de caminhos engenhosos como visto nos seguintes exercícios.

(a) Desenhe a estrutura da extremidade de um fragmento de DNA linear que foi produzido pela digestão de restrição por uma *Eco*RI (inclua aquelas seqüências remanescentes de uma seqüência de reconhecimento da *Eco*RI).

(b) Desenhe a estrutura resultante da reação desta seqüência terminal com a DNA polimerase I e os quatro desoxinucleosídeos trifosfato.

(c) Desenhe a seqüência produzida na junção resultante se as duas extremidades com a estrutura derivada em (b) estiverem ligadas.

(d) Desenhe a estrutura produzida se a estrutura derivada em (a) for tratada com uma nuclease que degrade apenas DNA de fita simples.

(e) Desenhe a seqüência da junção produzida se uma extremidade com a estrutura (b) for ligada a uma extremidade com a estrutura (d).

(f) Desenhe a estrutura da extremidade de um fragmento de DNA linear que foi produzido por uma digestão de restrição pela *Pvu*II (como em (a)).

(g) Desenhe a seqüência da junção produzida se uma extremidade com a estrutura (b) for ligada a uma extremidade com a estrutura (f).

(h) Suponha que você possa sintetizar um fragmento de DNA dúplex curto com qualquer seqüência que você deseja. Com tal fragmento sintético e os procedimentos descritos em (a) até (g), planeje um protocolo que remova um sítio de restrição da *Eco*RI de uma molécula de DNA e incorpore um novo sítio de restrição *Bam*HI aproximadamente na mesma localização (Indicação: veja Fig. 29-3).

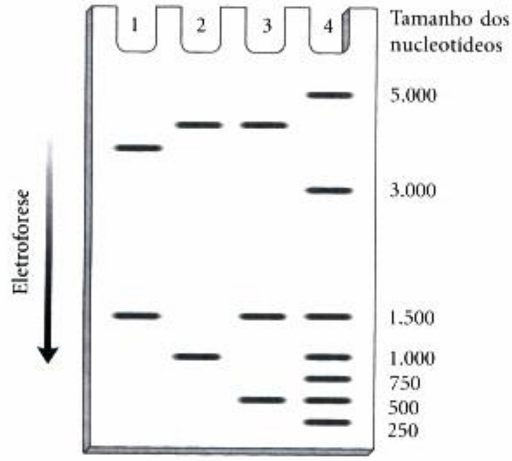
(i) Desenhe quatro fragmentos sintéticos curtos de DNA diferentes que permitiriam a ligação da estrutura (a) com o fragmento produzido pela digestão de restrição com a *Pst*I. Em um desses fragmentos sintéticos, desenhe a seqüência de forma tal que a junção final contenha as seqüências de reconhecimento para ambos, *Eco*RI e *Pst*I. No segundo e terceiro fragmentos sintéticos, desenhe a seqüência de forma tal que a junção contenha apenas a seqüência de reconhecimento da *Eco*RI ou *Pst*I, respectivamente. Desenhe a seqüência do quarto fragmento de forma que nem a seqüência da *Eco*RI nem a da *Pst*I apareçam na junção.

2. **Seleção para os plasmídios recombinantes**. Quando se clona um fragmento de DNA estranho num plasmídio é freqüentemente útil inserir o fragmento num sítio que interrompa um marcador de seleção (como o elemento de resistência à tetraciclina do pBR322). A perda da função do gene interrompido pode ser usada para identificar clones contendo plasmídios recombinantes com DNA estranho. Com um vetor bacteriófago λ não é necessário fazer isso, ainda que se possa distinguir facilmente vetores que incorporam fragmentos grandes de DNA estranho daqueles que não o fazem. Como são estes vetores recombinantes identificados?

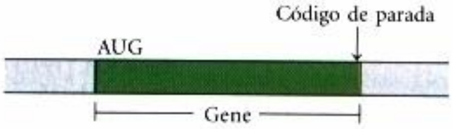
3. **Clonagem do DNA**. O vetor de clonagem plasmídio pBR322 (veja Fig. 29-5) é clivado com a endonuclease de restrição *Pst*I. Um fragmento de DNA isolado de um genoma eucariótico (também produzido pela clivagem com a *Pst*I) é adicionado ao vetor preparado e ligado. A mistura dos DNAs ligados é então usada para transformar a bactéria, e as bactérias contendo o plasmídio são selecionadas pelo crescimento na presença da tetraciclina.

(a) Além do plasmídio recombinante desejado, que outros tipos de plasmídios poderiam ser encontrados entre as bactérias transformadas que são resistentes à tetraciclina? Como eles são distinguidos?

(b) O fragmento de DNA clonado apresenta um tamanho de 1.000 pb e possui um sítio de *Eco*RI situado a 250 pb de uma das extremidades. Três plasmídios recombinantes diferentes foram clivados com a *Eco*RI e analisados por eletroforese em gel, mostrando o padrão abaixo. Qual deles representa o DNA clonado? Observe que, no pBR322, os sítios de restrição para *Pst*I e *Eco*RI estão afastados cerca de 750 pb. O plasmídio inteiro sem nenhum inserto clonado possui 4.361 pb. Os marcadores de tamanho na linha 4 mostra o número de nucleotídeos.



4. **Expressando um gene clonado**. Você isolou um gene de planta que codifica uma proteína na qual você está interessado. No desenho abaixo, indique as seqüências ou sítios de que você necessita para ter este gene transcrito, traduzido e regulado na *E. coli*.



5. **Identificando o gene para uma proteína com uma seqüência de aminoácidos conhecida**. Desenhe uma sonda de DNA que lhe permita identificar o gene para uma proteína com a seguinte seqüência de aminoácidos na extremidade aminoterminal. A sonda deve ter de 18 a 20 nucleotídeos de tamanho, um tamanho que forneça especificidade adequada se houver suficiente homologia entre a sonda e o gene.

$H_3\overset{+}{N}$–Ala–Pro–Met–Thr–Trp–Tyr–Cys–
Met–Asp–Trp–Ile–Ala–Gly–Gly–Pro–
Trp–Phe–Arg–Lys–Asn–Thr–Lys–

6. **Clonagem em plantas**. A estratégia resumida na Figura 29-19 emprega o *Agrobacterium*, contendo dois plasmídios separados. Sugira uma razão para que as seqüências nos dois plasmídios não sejam combinadas num plasmídio único.

7. **Clonagem nos mamíferos**. Os vetores retrovirais descritos na Figura 29-23 tornaram possível integrar eficientemente o DNA estranho num genoma de mamífero.

Explique como esses vetores, que não têm genes para a replicação e empacotamento virais (*gag, pol, env*), são montados em partículas virais. Sugira como é importante que esses vetores não tenham os genes de replicação e empacotamento.

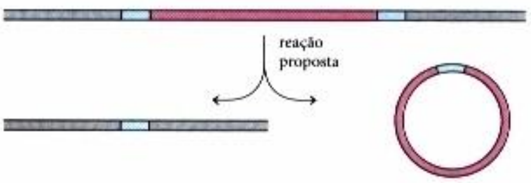
8. Montando um teste diagnóstico para uma doença genética. A doença de Huntington (HD) é uma desordem neurovegetativa herdável, caracterizada pelo gradual e irreversível desequilíbrio das funções psicológicas, motoras e cognitivas. Os sintomas aparecem tipicamente na idade adulta, mas podem também atingir qualquer idade. O curso da doença pode durar de 15 a 20 anos. As bases moleculares da doença estão crescendo bem no seu entendimento. A mutação genética apresentada no HD tem sido vista em um gene que codifica uma proteína (M_r 350.000) de função desconhecida. Nos indivíduos que não desenvolvem a HD, a região do gene que codifica o aminoterminal da proteína tem uma seqüência de código CAG (para a glutamina), a qual é repetida numa sucessão de 6 a 39 vezes. Nos indivíduos que na fase adulta apresentam a HD, este código é repetido mais de 70 vezes. O comprimento da repetição desse simples trinucleotídeo indica se um indivíduo desenvolverá a HD e em que idade aproximadamente os primeiros sintomas aparecem.

Um pequena porção da seqüência codificadora do aminoterminal das 3.143 do gene para HD é mostrada abaixo. A seqüência de nucleotídeos do DNA está mostrada em preto, a seqüência de aminoácidos da fase de leitura aberta em azul e a repetição CAG está sombreada. Construa um teste baseado em PCR para a HD ser realizada, usando uma amostra de sangue. Assuma que o iniciador para a PCR deva ter um tamanho de 25 nucleotídeos. Você pode desejar recorrer ao Capítulo 26 (pág. 772) para as convenções na exibição das seqüências gênicas.

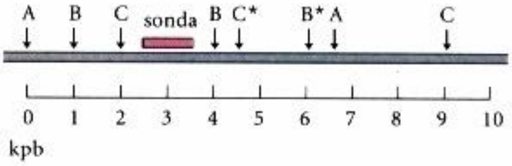
```
307  ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC
1     M  A  T  L  E  K  L  M  K  A  F  E  S  L  K  S  F

358  CAGCAGTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
18    Q  Q  F  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q

409  CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCCG
35    Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  P  P  P  P  P  P  P  P

460  CCGCCTCCTCAGCTTCCTCAGCCGCCGCCG
52    P  P  P  Q  L  P  Q  P  P  P
```

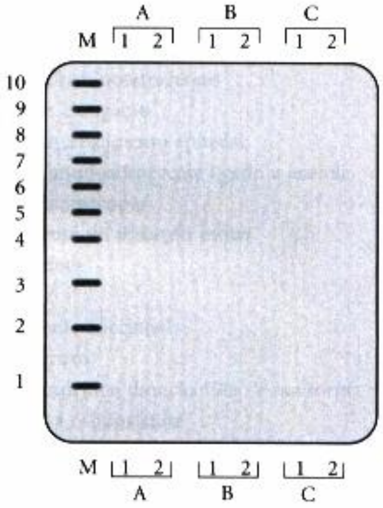
Fonte: The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983.

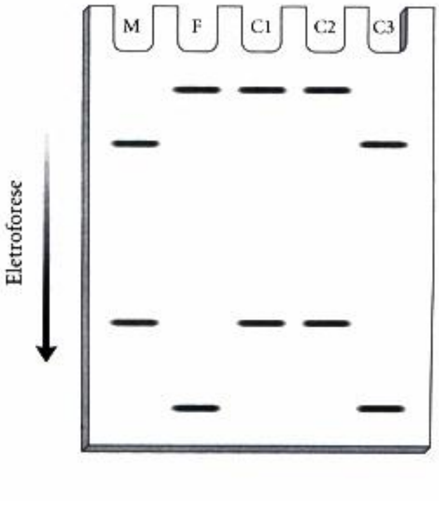
9. Uso de PCR para detectar moléculas de DNA circular. Um segmento de DNA genômico em um protozoário ciliado é, algumas vezes, deletado. A deleção é um reação geneticamente programada e associada com a fusão celular. Um pesquisador propôs que o DNA é deletado num evento de recombinação sítio-específica (Fig. 25-36), o produto da reação do DNA deletado termina com um DNA circular como mostrado abaixo. Sugira como o pesquisador pode usar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença da forma circular no DNA deletado num extrato do protozoário.



10. Impressão digital do DNA e análise do RFLP. O DNA é extraído das células sangüíneas de dois indivíduos diferentes. Em experimentos separados, o DNA de cada indivíduo é clivado com as endonucleases de restrição A, B e C. Um mapa é mostrado com um segmento de 10.000 pares de bases do cromossomo humano. O indivíduo #2 tem mutações pontuais que eliminam os sítios de reconhecimento para as restrições B* e C*. Sonde o gel com um oligonucleotídeo complementar para a seqüência indicada e exponha o gel com um filme de raios X. Indique onde você esperaria ver as bandas sobre o filme. As linhas do gel estão marcadas na figura que acompanha.





11. Análise do RFLP para teste de paternidade. A impressão digital do DNA e a análise do RFLP são, muitas vezes, usadas para o teste de paternidade. A criança herda os cromossomos de ambos, pai e mãe, tal que o DNA de cada criança mostra fragmentos de restrição derivados do pai e da mãe. No gel, aqui mostrado, qual criança, se existe alguma, pode ser excluída como sendo descendente biológico do pai? Explique suas razões. A linha M é a amostra originada da mãe, F originada do pai, e C1, C2 e C3 originadas das crianças.